II

(Atti mhux leġiżlattivi)

REGOLAMENTI

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (UE) 2019/1390

tal-31 ta' Lulju 2019

li jemenda, għall-finijiet tal-adattament tiegħu għall-progress tekniku, l-Anness tar-Regolament (KE) Nru 440/2008 li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skont ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH)

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI EWROPEA,

Wara li kkunsidrat it-Trattat dwar il-Funzjonament tal-Unjoni Ewropea,

Wara li kkunsidrat ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni [1], u b'mod partikolari l-Artikolu 13(2) tiegħu,

Billi:

(1) Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 440/2008 [2] fih il-metodi ta' ttestjar li jintużaw biex jiġu determinati l-proprjetajiet fiżikokimiċi, it-tossiċità u l-ekotossiċità ta' sustanzi kimiċi li għandhom jiġu applikati għall-finijiet tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006.

(2) L-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi (OECD) tiżviluppa linji gwida armonizzati u miftiehma f'livell internazzjonali għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi għal skopijiet regolatorji. L-OECD b'mod regolari toħroġ linji gwida ġodda u riveduti dwar l-ittestjar, filwaqt li tqis il-progress xjentifiku f'dan il-qasam.

(3) Biex jittieħed kont tal-progress tekniku u, kull fejn possibbli, biex jitnaqqas in-numru ta' annimali użati għall-finijiet sperimentali f'konformità mal-Artikolu 13(2) tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006, wara l-adozzjoni tal-linji gwida rilevanti tal-OECD dwar l-ittestjar, jenħtieġ li jiġu stabbiliti żewġ metodi ta' ttestjar ġodda għall-valutazzjoni tal-ekotossiċità u disa' metodi ta' ttestjar ġodda għad-determinazzjoni tat-tossiċità għas-saħħa tal-bniedem u jenħtieġ li jiġu aġġornati seba' metodi ta' ttestjar. Ħdax minn dawk il-metodi ta' ttestjar huma relatati ma' testijiet in vitro għall-irritazzjoni/korrużjoni dermali u tal-għajnejn, għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, għall-ġenotossiċità u għall-effetti endokrinali. Il-partijiet ikkonċernati ġew ikkonsultati dwar l-emenda proposta.

[1] ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.

[2] Ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 440/2008 tat-30 ta' Mejju 2008 li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skont ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH) (ĠU L 142, 31.5.2008, p. 1).

(4) Għalhekk, ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 jenħtieġ li jiġi emendat skont dan.

(5) Il-miżuri previsti f'dan ir-Regolament huma konformi mal-opinjoni tal-Kumitat imwaqqaf permezz tal-Artikolu 133 tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

L-Anness tar-Regolament (KE) Nru 440/2008 hu emendat f'konformità mal-Anness ta' dan ir-Regolament.

Artikolu 2

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

Dan ir-Regolament għandu jorbot fl-intier tiegħu u japplika direttament fl-Istati Membri kollha.

Magħmul fi Brussell, il-31 ta' Lulju 2019.

Għall-Kummissjoni
Il-President
Jean-Claude JUNCKER

ANNESS

L-Anness tar-Regolament (KE) Nru 440/2008 hu emendat kif ġej:

(1) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.4 hu sostitwit b'dan li ġej:

"B.4 **IRRITAZZJONI DERMALI AKUTA/KORRUŻJONI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 404 tal-OECD (2015). Il-linji gwida tal-OECD għall-ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien biex jiġi żgurat li dawn jirriflettu l-aħjar xjenza disponibbli. Fir-rieżami tat-TG 404 tal-OECD, ingħatat attenzjoni speċjali għat-titjib possibbli b'rabta ma' dak li jikkonċerna l-benessri tal-annimali u għall-evalwazzjoni tal-informazzjoni eżistenti kollha dwar is-sustanza kimika tat-test biex ikunu evitati testijiet mingħajr ħtieġa fuq l-annimali tal-laboratorju. Il-verżjoni aġġornata tat-TG 404 tal-OECD (oriġinarjament adottata fl-1981, riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) tinkludi referenza għad-Dokument ta' Gwida dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Irritazzjoni/Korrużjoni tal-Ġilda (1), filwaqt li tipproponi approċċ modulari għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda u għall-korrużjoni tal-ġilda. L-IATA jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u (i) jipprovdi gwida dwar kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (1). Barra minn dan, il-Linja Gwida tirrakkomanda, meta tkun meħtieġa, l-applikazzjoni suċċessiva, minflok simultanja, tat-tliet kumpressi tat-test għall-annimal fit-test inizjali *in vivo*.

2. Id-definizzjonijiet ta' irritazzjoni u ta' korrużjoni dermali huma stabbiliti fl-Appendiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

3. Fl-interess kemm tax-xjenza solida kif ukoll tat-trattament xieraq tal-annimali, l-ittestjar *in vivo* ma għandux isir qabel ma *d-data* disponibbli kollha rilevanti għall-korrużività/irritazzjoni dermali potenzjali tas-sustanza kimika tat-test tkun ġiet evalwata f'analiżi tal-piż tal-evidenza (WoE) kif ippreżentata fid-Dokument ta' Gwida dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, jiġifieri fuq it-tliet Partijiet ta' din il-gwida u l-moduli korrispondenti tagħhom (1). Fil-qosor, fil-Parti 1 id-*data* eżistenti tiġi indirizzata fuq seba' moduli li jkopru d-*data* umana, id-*data in vivo*, id-*data in vitro*, id-*data* dwar il-proprjetajiet fiżikokimiċi (eż. pH, b'mod partikolari aċidità jew alkalinità b'saħħitha) u metodi mhux ta' ttestjar. Fil-Parti 2 issir l-analiżi tad-WoE. Jekk din l-analiżi tad-WoE tibqa' inkonklużiva, il-Parti 3 għandha ssir permezz ta' ttestjar addizzjonali, l-ewwel b'metodi *in vitro*, u bl-ittestjar *in vivo* li jintuża bħala l-aħħar istanza. Għaldaqstant, din l-analiżi għandha tnaqqas il-ħtieġa għall-ittestjar *in vivo* għall-korrussività/irritazzjoni dermali ta' sustanza kimika tat-test li għalihom diġà jkun hemm biżżejjed evidenza minn studji oħra rigward dawk iż-żewġ punti ta' tmiem.

PRINĊIPJU TAT-TEST IN VIVO

4. Is-sustanza kimika tat-test li għandha tkun ittestjata tiġi applikata f'doża singola għall-ġilda ta' annimal sperimentali; iż-żoni tal-ġilda mhux trattati tal-annimal tat-test iservu għall-kontroll. Il-grad tal-korrużjoni/irritazzjoni ikun moqri u rreġistrat matul intervalli speċifiċi u jkun deskritt aktar biex jipprovdi evalwazzjoni sħiħa tal-effetti. Id-durata tal-istudju għandha tkun suffiċjenti biex ikunu evalwati r-riversibbiltà jew in-nuqqas ta' riversibbiltà tal-effetti osservati.

5. L-annimali li juru sinjali kontinwi ta' tbatija u/jew uġigħ severi fi kwalunkwe stadju tat-test għandhom jinqatlu bl-ewtanażja, u s-sustanza kimika tat-test għandha tkun ivvalutata kif xieraq. Il-kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni biex jinqatlu bl-ewtanażja l-annimali fi stat ta' agunija jew ta' tbatija severa huma spjegati f'Dokument ta' Gwida separat (2).

PREPARAMENTI GĦAT-TEST IN VIVO

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

6. Il-fenek albino hu l-annimal preferut tal-laboratorju, u jintużaw fniek adulti żgħar f'saħħithom. Ir-raġuni għall-użu ta' speċi oħra għandha tiġi pprovduta.

Preparazzjoni tal-annimali

7. Madwar 24 siegħa qabel it-test, is-suf għandu jitneħħa bi tqaxxir taż-żona dorsali minn fuq id-dahar l-annimali. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat li tinbarax il-ġilda, u għandhom jintużaw biss dawk l-annimli li jkunu b'saħħithom u li jkollhom ġilda intatta.

8. Uħud mir-razez tal-fniek ikollhom irqajja' folti ta' suf li jkunu aktar prominenti f'ċerti żminijiet tas-sena. Tali żoni ta' tkabbir ta' suf folt ma għandhomx jintużaw bħala siti tat-testijiet.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u tal-għalf

9. L-annimali għandhom jinżammu f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali esperimentali għandha tkun ta' 20 °C (± 3 °C) għall-fniek. Filwaqt li l-umdità relattiva għandha tkun tal-anqas ta' 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb

PROĊEDURA TAT-TEST

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

10. Is-sustanza kimika tat-test għandha tkun applikata fuq żona żgħira (madwar 6 cm^2) tal-ġilda u tinkesa b'kumpressa b'garża, li tinżamm fil-post bi stikk mhux irritanti. Fil-każi li fihom l-applikazzjoni diretta ma tkunx possibbli (eż. likwidi u ċerti pejsts), is-sustanza kimika tat-test l-ewwel għandha tkun applikata fuq kumpressa b'garża, li mbagħad tkun applikata fuq il-ġilda. Il-kumpressa għandha tinżamm f'kuntatt laxk mal-ġilda permezz ta' faxxa semiokklużiva adattata għad-durata tal-esponiment. Jekk is-sustanza kimika tat-test tkun applikata fuq il-kumpressa, din għandha titwaħħal mal-ġilda b'tali mod li jkun hemm kuntatt tajjeb u distribuzzjoni uniformi tas-sustanza kimika tat-test mal-ġilda. L-aċċess mill-annimal għall-kumpressa u l-inġestjoni jew it-teħid man-nifs tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu evitati.

11. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test ġeneralment jintużaw fi stat mhux dilwit. Meta jsiru t-testijiet ta' solidi (li jistgħu jitfarrku, jekk dan jitqies li jkun meħtieġ), is-sustanza kimika tat-test għandha tkun niedja b'ammont żgħir ilma (jew, meta meħtieġ, b'xi veikolu adattat ieħor) li jkun suffiċjenti biex jiżgura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Meta jintużaw veikoli oħra apparti l-ilma, l-influwenza potenzali tal-veikolu fuq l-irritazzjoni tal-ġilda mis-sustanza kimika tat-test għandha tkun minima, jekk tkun preżenti affattu.

12. Fit-tmiem tal-perjodu tal-esponiment, li normalment ikun ta' erba' sigħat, is-sustanza kimika tat-test residwa għandha titneħħa, fejn prattikabbli, bl-użu tal-ilma jew ta' xi solvent xieraq mingħajr ma jitbiddlu r-rispons eżistenti jew l-integrità tal-epidermis.

Livell tad-doża

13. Doża ta' 0,5 ml likwidu jew 0,5 g solidu jew pejst tiġi applikata fiż-żona tat-test.

Test inizjali (Test *in vivo* għall-irritazzjoni/korrużjoni dermali bl-użu ta' annimal wieħed)

14. Meta sustanza kimika tat-test tiġi ġudikata bħala korrużiva, irritanti jew mhux klassifikata fuq il-bażi ta' analiżijiet tal-piż tal-evidenza jew ta' ttestjar *in vitro* preċedenti, normalment ma jkunx hemm bżonn ta' ttestjar *in vivo* ulterjuri. Madankollu, fil-każijiet li fihom id-*data* addizzjonali titqies ġustifikata, it-test *in vivo* għall-ewwel isir bl-użu ta' annimal wieħed u billi jiġi applikat l-approċċ segwenti. Sa tliet kumpressi tat-test jiġu applikati b'mod sekwenzjali fuq l-annimal. L-ewwel kumpressa titneħħa wara tliet minuti. Jekk ma tiġi osservata ebda reazzjoni serja tal-ġilda, tiġi applikata t-tieni kumpressa f'sit differenti u din titneħħa wara sagħa. Jekk l-osservazzjonijiet f'dan l-istadju jindikaw li l-esponiment jista' jitħalla b'mod uman għal erba' sigħat, tiġi applikata t-tielet kumpressa u din titneħħa wara erba' sigħat, u jiġi gradat ir-rispons.

15. Jekk effett korrossiv ikun osservat wara kwalunkwe wieħed mit-tliet esponimenti sekwenzali, it-test jiġi terminat minnufih. Jekk effett korrossiv ma jkunx osservat wara li titneħħa l-aħħar kumpressa, l-annimal ikun osservat għal 14-il jum, sakemm il-korrużjoni ma tkunx żviluppat f'xi punt aktar kmieni.

16. F'dawk il-każijiet li fihom is-sustanza kimika tat-test ma tkunx mistennija tipproduċi korrużjoni imma tista' tkun irritanti, għandha tiġi applikata kumpressa waħda fuq annimal wieħed għal erba' sigħat.

Test konfermatorju (Test *in vivo* għal irritazzjoni dermali b'annimali addizzjonali)

17. Jekk effett korrużiv ma jkunx osservat fit-test inizjali, l-irritant jew ir-rispons negattiv għandu jiġi kkonfermat bl-użu ta' massimu ta' żewġ annimali oħra, kull wieħed b'kumpressa waħda, għal perjodu ta' esponiment ta' erba' sigħat. Jekk effett irritanti jkun osservat fit-test inizjali, it-test konfermatorju jista' jitwettaq b'mod sekwenzali, jew bl-esponiment ta' żewġ annimali addizzjonali fl-istess ħin. Fil-każ eċċezzjonali li fih ma jsirx it-test inizjali, żewġ annimali jew tlieta jistgħu jiġu ttrattati b'kumpressa waħda, li titneħħa wara erba' sigħat. Meta jintużaw żewġ annimali, jekk it-tnejn li huma juru l-istess rispons, ma jkun meħtieġ isir ebda ttestjar ulterjuri. Inkella, jiġi ttestjat it-tielet annimal ukoll. Risponsi ekwivoċi ikunu jeħtieġu evalwazzjoni bl-użu ta' annimali addizzjonali.

Perjodu ta' osservazzjoni

18. Id-durata tal-perjodu ta' osservazzjoni għandha tkun suffiċjenti biex tkun evalwata bis-sħiħ ir-riversabbiltà tal-effetti osservati. Minkejja dan, l-esperiment għandu jiġi terminat fi kwalunkwe waqt jekk l-annimal juri sinjali kontinwi ta' uġigħ jew ta' tbatija serji. Biex ikunu determinati l-effetti tar-riversibbiltà, l-annimali għandhom ikunu osservati sa 14-il jum wara t-tneħħija tal-kumpressi. Jekk ir-riversibbiltà tkun osservata qabel l-14-il jum, l-esperiment għandu jiġi terminat f'dak il-waqt.

Osservazzjonijiet kliniċi u l-iggradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda

19. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għal sinjali ta' eritema u ta' edema, u r-risponsi reġistrati wara 60 minuta, u mbagħad 24, 48 u 72 sagħa wara t-tneħħija tal-kumpressa. Għat-test inizjali fuq annimal wieħed, issit tat-test ikun ukoll eżaminat immedjatament wara li titneħħa l-kumpressa. Ir-reazzjonijiet dermali huma ggradati u rreġistrati skont il-gradi fit-Tabella ta' hawn taħt. Jekk ikun hemm ħsara fil-ġilda li ma tistax tiġi identifikata bħala irritazzjoni jew korrużjoni wara 72 sagħa, l-osservazzjonijiet jistgħu jkunu meħtieġa sal-jum 14 biex tkun determinata r-riversibbiltà tal-effetti. B'żieda mal-osservazzjonijiet tal-irritazzjoni, l-effetti tossiċi lokali kollha, bħal ma huma n-nuqqas ta' xaħam min taħt il-ġilda, u kwalunkwe effett sistematiku avvers (eż. l-effetti fuq sinjali kliniċi ta' tossiċità u l-piż tal-ġisem), għandhom ikunu deskritti bis-sħiħ u rreġistrati. L-eżami istopatoloġiku għandu jiġi kkunsidrat biex jiċċara risponsi ekwivoċi.

20. L-iggradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda bilfors li jkun soġġettiv. Biex tkun imħġeġġa l-armonizzazzjoni fl-iggradar tar-rispons tal-ġilda u biex ikunu meġħjuna l-laboratorji tat-testijiet u dawk involuti fit-twettiq u fl-interpretazzjoni tal-osservazzjonijiet, il-persunal li jagħmel l-osservazzjonijiet irid ikun imħarreġ b'mod adegwat fis-sistema tal-iggradar użata (ara t-Tabella ta' hawn taħt). Gwida illustrata għall-iggradar tal-irritazzjoni tal-ġilda u ta' leżjonijiet oħra tista' tkun ta' għajnuna (3).

DATA U RAPPORTAR

21. Ir-riżultati tal-istudju għandhom ikunu miġbura f'forma tabulari fir-rapport tat-test finali u għandhom ikopru l-punti kollha elenkati fil-paragrafu 24.

Evalwazzjoni tar-riżultati

22. Il-punteġġi tal-irritazzjoni dermali għandhom ikunu evalwati flimkien man-natura u mas-severità tal-leżjonijiet, u mar-riversibbiltà jew man-nuqqas ta' riversibbiltà tagħhom. Il-punteġġi individwali ma jirrappreżentawx norma assoluta għall-propjetajiet irritanti ta' xi materjal, minħabba li jiġu evalwati wkoll effetti oħra tal-materjal tat-test. Minflok, il-punteġġi individwali għandhom jitqiesu bħala valuri referenzjarji, li jridu jkunu evalwati flimkien mal-osservazzjonijiet l-oħra kollha li jirriżultaw mill-istudju.

23. Ir-riversibbiltà tal-leżjonijiet dermali wkoll għandha tkun ikkunsidrata fl-evalwazzjoni tar-risponsi irritanti. Meta r-risponsi bħalma huma l-alopeċja (żona limitata), l-iperkeratożi, l-iperplażja u l-esfoljazzjoni, jippersistu sa tmiem il-perjodu ta' 14-il jum osservazzjoni, is-sustanza kimika tat-test għandha titqies bħala irritant.

Rapport tat-test

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

Il-ħsieb wara l-ittestjar in vivo:

— Analiżi tal-piż tal-evidenza tad-*data* preeżistenti tat-test, inklużi r-riżultati minn strateġija ta' ttestjar sekwenzjali;

— Deskrizzjoni tad-*data* rilevanti disponibbli mill-ittestjar preċedenti;

— *Data* miksuba f'kull stadju tal-istrateġija ta' ttestjar;

— Deskrizzjoni tat-testijiet *in vitro* mwettqa, inklużi d-dettalji tal-proċeduri, ir-riżultati miksuba bis-sustanzi tat-test/referenza;

— Analiżi tal-piż tal-evidenza għat-twettieq tal-istudju *in vivo*.

Sustanza kimika tat-test:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, taħlita u sustanzi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti b'reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi (UVCB): ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tiswin, it-thin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Il-veikolu:

— L-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (fejn xieraq), il-volum użat;

— Il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

L-annimal(i) tat-test:

— L-ispeċi/ir-razza użata, ir-raġuni wara l-użu ta' annimal(i) li mhuwiex fenek albino;

— In-numru tal-annimal(i) għal kull sess;

— Il-piż(ijiet) tal-annimali individwali, kemm fil-bidu kif ukoll fil-konklużjoni tat-test;

— L-età fil-bidu tal-istudju;

— Is-sors tal-annimal(i), il-kundizzjonijiet tal-abitazzjoni, id-dieta, eċċ.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— It-teknika tal-preparazzjoni tas-sit tal-kumpressa;

— Id-dettalji dwar il-materjali tal-kumpressa użati u t-teknika tal-kumpressa;

— Id-dettalji dwar il-preparazzjoni, l-applikazzjoni u t-tneħħija tas-sustanza kimika tat-test.

Ir-riżultati:

— Tabulazzjoni tal-punteġġi tar-rispons/korrużjoni għal kull annimal fil-punti kollha tal-ħin imkejla;

— Id-deskrizzjonijiet tal-leżjonijiet kollha, kif osservati;

— Id-deskrizzjoni narrattiva tan-natura u l-grad tal-irritazzjoni jew tal-korrużjoni osservati, u kwalunkwe sejba istopatoloġika;

— Id-deskrizzjoni ta' effetti avversi lokali (eż. tneħħija tax-xaħam minn taħt il-ġilda) u sistematiċi oħra minbarra l-irritazzjoni jew il-korrużjoni dermali.

Diskussjoni dwar ir-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/ Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, kif approvata mit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat tas-Sustanzi Kimiċi u tal-Grupp ta' Ħidma dwar is-Sustanzi Kimiċi, Novembru 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

Tabela

Iggradar tar-reazzjonijiet tal-?ilda

Formazzjoni ta' Eritema u ta' Eskara

Ebda eritema	0
Eritema ħafifa ħafna (kemm kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura tal-laħam) sa formazzjoni ta' eskara li tipprevjeni l-iggradar tal-eritema	4

Il-massimu possibbli: 4

Il-Formazzjoni ta Edema

Ebda edema	0
Edema ħafifa ħafna (kemm kemm tidher)	1
Edema ħafifa (il-ġnub taż-żona huma definiti sew b'nefħiet definiti)	2
Edema moderata (nefħa ta' madwar 1 mm)	3
Edema severa (nefħa akbar minn 1 mm u tifrix lil hinn miż-żona tal-esponiment)	4

Il-massimu possibbli: 4

L-eżami istopatoloġiku għandu jitwettaq biex jiċċara risponsi ekwivoċi.

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika hi sustanza jew taħlita.

Irritazzjoni dermali hi l-produzzjoni ta' ħsara riversibbli fil-ġilda wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat.

Korrużjoni dermali hi l-produzzjoni ta' ħsara irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrożi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minħabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopeċja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom ikun hemm dubju.

Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar"

(2) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.17 hu ssostitwit b'dan li ġej:

"B.17 **TESTIJIET *IN VITRO* TAL-MUTAZZJONI ĠENETIKA FUQ ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI BL-UŻU TAL-ĠENI HPRT U XPRT**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 476 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu u tat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni riveduta kurrenti tat-TM B.17 tirrifletti kważi tletin sena esperjenza b'dan it-test u tirriżulta wkoll mill-iżvilupp ta' metodu ġdid separat dedikat għal testijiet *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi bl-użu tal-ġene tat-timidina kinaži. TM B.17 hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppat dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (1).

2. L-iskop tat-test *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi hu li jindividwa l-mutazzjonijiet ġenetiċi indotti mis-sustanzi kimiċi. Il-linji ta' ċelloli użati f'dawn it-testijiet ikejlu l-mutazzjonijiet 'il quddiem fil-ġeni indikaturi, speċifikament il-ġene endoġenu ipoksantina-gwanina fosforibożil trasferaži (Hprt f'ċelloli ta' rodituri, HPRT f'ċelloli umani; kollettivament imsejħa l-ġene Hprt u t-test HPRT f'dan il-metodu ta' ttestjar), u t-transġene ksantina-gwanina fosforibożil trasferaži (gpt) (imsejjaħ it-test XPRT). It-testijiet ta' mutazzjoni HPRT u XPRT jiżvelaw dehriet differenti ta' avvenimenti ġenetiċi. Minbarra l-avvenimenti mutazzjonali individwati mit-test HPRT (eż. sostituzzjonijiet tal-pari bażi, tibdil fil-qari ġenetiku, tħassiriet żgħar u inserzjonijiet) il-lokazzjoni awtosomali tat-transġene gpt tista' tippermetti l-iżvelar ta' mutazzjonijiet li jirriżultaw minn tħassiriet kbar u possibilment rikombinazzjoni mitotika mhux żvelata mit-test HPRT għaliex il-ġene Hprt jinsab fil-kromożoma X (2) (3) (4) (5) (6) (7). L-XPRT bħalissa jintuża anqas mit-test HPRT għal skopijiet regolatorji.

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. Ġeneralment it-testijiet imwettqa *in vitro* jeħtieġu l-użu ta' sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika. Is-sistema esoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*.

5. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati kundizzjonijiet li jkunu jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali, (jiġifieri interazzjonijiet possibbli mas-sistema tat-test), mhux ikkawżati minn interazzjoni diretta bejn is-sustanzi kimiċi tat-test u l-materjal ġenetiku taċ-ċellola; tali kundizzjonijiet jinkludu tibdiliet fil-pH jew fl-ożmolalità (8) (9) (10), interazzjoni mal-komponenti tal-medium (11) (12) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossiċità (13). Ċitotossiċità li taqbeż il-livelli massimi rakkomandati ta' ċitotossiċità kif definiti fil-paragrafu 19 titqies eċċessiva għat-test HPRT.

6. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. Iċ-ċelloli mutanti nieqsa mill-attività tal-enzima Hprt fit-test HPRT jew mill-attività tal-enzima prt fit-test XPRT huma reżistenti għall-effetti ċitostatiċi tal-analogu tal-purina 6-tjogwanina (TG). Iċ-ċelloli proficjenti fl-Hprt (fit-test HPRT) jew fil-gpt (fit-test XPRT) huma sensittivi għat-TG, li joħloq l-inibizzjoni tal-metaboliżmu ċellolari u jwaqqaf aktar diviżjoni fiċ-ċelloli. B'hekk, iċ-ċelloli mutanti jkunu jistgħu jipproliferaw fil-preżenza tat-TG, filwaqt li ċelloli normali, li fihom l-enzima Hprt (fit-test HPRT) jew gpt (fit-test XPRT) ma jkunux.

8. Ċelloli f'sospensjoni jew f'kolturi monosaff jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test, kemm b'sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr (ara l-paragrafu 14), għal perjodu xieraq ta' żmien (3-6 sigħat), u mbagħad jiġu subkolturati biex tiġi determinata ċ-ċitotossiċità u titħalla l-espressjoni fenotipika qabel l-għażla tal-mutant (14) (15) (16) (17). Iċ-ċitotossiċità tiġi determinata mis-sopravivenza relattiva (RS), jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni mkejla eżatt wara t-trattament u aġġustata għal kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-kontroll negattiv (paragrafu 18 u Appendiċi 2). Il-kolturi ttrattati jinżammu f'medium tat-tkabbir għal perjodu ta' żmien suffiċjenti, karatteristiku ta' kull tip ta' ċellola, biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutazzjonijiet indotti (tipikament minimu ta' 7-9 ijiem). Wara l-espressjoni fenotipika, il-frekwenza mutanti tiġi stabbilita biż-żrigħ ta' għadd magħruf ta' ċelloli f'medium li jkun fih l-aġent selettiv biex jiġu żvelati l-kolonji mutanti, u f'medium mingħajr aġent selettiv biex tiġi żvelata l-effiċjenza tal-klonazzjoni (vijabbiltà). Wara perjodu xieraq ta' inkubazzjoni, jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Ċelloli

9. It-tipi ta' ċelloli użati għat-testijiet HPRT u XPRT għandu jkollhom sensittività murija għal mutaġeni kimiċi, effiċjenza għolja tal-klonazzjoni, karjotip stabbli, u frekwenza mutanti spontanja stabbli. L-aktar ċelloli użati ta' spiss għat-test HPRT jinkludu l-linji CHO, CHL u V79 taċ-ċelloli tal-hamster Ċiniż, ċelloli tal-linfoma tal-ġrieden L5178Y, u ċelloli linfoblastojdi umani TK6 (18) (19). Għat-test XPRT jintużaw iċ-ċelloli AS52 derivati mis-CHO li fihom it-transġene gpt (u li jitħassrilhom il-ġene Hprt) (20) (21); it-test HPRT ma jistax isir f'ċelloli AS52 għaliex il-ġene hprt ikun tħassar. L-użu ta' linji ta' ċelloli oħra għandu jkun ġustifikat u validat.

10. Il-linji ta' ċelloli għandhom jiġu verifikati b'mod regolari għall-istabbiltà tal-għadd ta' kromożomi modali u l-assenza ta' kontaminazzjoni tal-Mikoplażma (22) (23), u ċ-ċelloli ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati jew jekk jinbidel l-għadd ta' kromożomi modali. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli użat fil-laboratorju tal-ittestjar għandu jkun stabbilit u konsistenti mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati. Il-frekwenza mutanti spontanja fiċ-ċelloli omm prinċipali għandha tiġi verifikat wkoll, u ċ-ċelloli omm ma għandhomx jintużaw jekk il-frekwenza mutanti ma tkunx aċċettabbli.

11. Qabel l-użu f'dan it-test, il-kolturi jaf ikollhom bżonn jitnaddfu miċ-ċelloli mutanti preeżistenti, eż. bil-kolturazzjoni f'medium HAT għat-test HPRT u MPA għat-test XPRT (5) (24) (Ara l-Appendiċi 1). Iċ-ċelloli mnaddfa jistgħu jiġu krijopreservati u mbagħad jinħallu biex jintużaw bħala ċelloli omm għall-użu. Iċ-ċelloli omm għall-użu li jkunu għadhom kif inħallew jistgħu jintużaw għat-test wara li jinkisbu ħinijiet normali tal-irdoppjar. Meta jsir it-test XPRT, il-koltura ta' rutina taċ-ċelloli AS52 għandha tuża kundizzjonijiet li jiżguraw iż-żamma tat-transġene gpt (20).

Kundizzjonijiet tal-media tal-koltura

12. Għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tat-tkabbir u tal-inkubazzjoni (reċipjenti tal-koltura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO_2, u temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37 °C) għaż-żamma tal-kolturi. Il-kolturi taċ-ċelloli dejjem għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet li jiżguraw li jkunu qed jikbru fil-fażi log. Hu partikolarment importanti li l-kundizzjonijiet tal-media u tal-kolturi jingħażlu hekk li jiżguraw l-iżvilupp ottimali taċ-ċelloli matul il-perjodu ta' espressjoni u l-effiċjenza ottimali tal-klonazzjoni kemm għaċ-ċelluli mutanti kif ukoll għal dawk mhux mutanti.

Preparazzjoni tal-kolturi

13. Il-linji taċ-ċelloli huma propagati minn kolturi omm, miżrugħa fil-medium tat-tkabbir b'densità tali li ċ-ċelloli f'sospensjonijiet jew f'monosaffi jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali matul it-trattament u l-perjodi ta' espressjoni kollha kemm huma (eż. għandha tiġi evitata konfluwenza għal ċelloli li jikbru f'monosaffi).

Attivazzjoni metabolika

14. Għandhom jintużaw sistemi metabolizzanti esoġeni meta jintużaw ċelloli b'kapaċità metabolika endoġena inadegwata. L-aktar sistema użata spiss, li hi l-ewwel rakkomandata, sakemm ma jkunx ġustifikat mod ieħor, hi frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imħejjija mill-fwied ta' rodituri (ġeneralment firien) ittrattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) jew taħlita ta' fenobarbital u β-naftoflavon (29) (30) (31) (32). Din it-taħlita msemmija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes (33) u ntwera li hi effettiva daqs Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidażijiet b'funzjoni mħallta (29) (59) (31). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1 sa 2 % (v/v) iżda tista'tiżdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-għażla tat-tip u tal-konċentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena jew tal-induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi li jiġu ttestjati (34) (35) (36).

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

15. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 16). Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokolli standard, bħat-trattament f'reċipjenti tal-koltura ssiġillati (37) (38). Il-preparati tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin.

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST

Solventi

16. Is-solvent għandu jingħażel biex tiġi ottimizzata s-solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test mingħajr ma jitħalla impatt avvers fuq it-twettiq tal-assaġġ, eż. tibdil fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-koltura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Hu rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tat-tkabbir). Pereżempju, fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma u s-sulfossidu tad-dimetil. Ġeneralment, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbżu l-1 % (v/v) u s-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbżu l-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk is-solventi użati ma jkunux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn *data* li tindika l-kompatibbiltà tagħhom mas-sustanzi kimiċi tat-test u mas-sistema tat-test, u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika bil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-*data ta*' sostenn, importanti li jiġu inklużi kontrolli mhux trattati (ara l-Appendiċi 1) biex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduċi ebda effett dannuż jew mutaġeniku.

Kejl taċ-ċitotossiċità u għażla tal-konċentrazzjonijiet tal-esponiment

17. Meta wieħed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva (ara l-paragrafu 20), il-preċipitazzjoni fil-medium tat-tkabbir (ara l-paragrafu 21), jew tibdiliet ċari fil-pH jew fl-ożmolalità (ara l-paragrafu 5). Jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tibdil ċar fil-pH tal-medium fi żmien iż-żieda, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali biex jiġu evitati riżultati pożittivi artefattwali u biex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-koltura.

18. L-għażla tal-konċentrazzjoni hi bbażata fuq iċ-ċitotossiċità u fuq kunsiderazzjonijiet oħra (ara l-paragrafi 20-22). Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità f'test inizjali tista' tkun siewja biex jiġu definiti aħjar il-konċentrazzjonijiet li jkunu se jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex meħtieġ. Anki jekk issir evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità inizjali, il-kejl taċ-ċitotossiċità għal kull koltura xorta waħda jkun meħtieġ fl-esperiment ewlieni. Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi evalwata bl-użu tal-RS, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament, fuq il-bażi tal-għadd taċ-ċelloli, meta mqabbla mal-aġġustament tal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

19. Għandhom jiġu evalwati tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inklużi l-kontrolli tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (iċ-ċitotossiċità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Filwaqt li l-użu ta' kolturi duplikati hu rakkomandat, jistgħu jintużaw kolturi repliki jew trattati individwalment f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Ir-riżultati miksuba fil-kolturi rreplikati indipendenti f'konċentrazzjoni partikolari għandhom jiġu rrapportati b'mod separat iżda jistgħu jiġu aggregati għall-analiżi tad-*data* (17). Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru tossiċità baxxa jew ebda tossiċità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-triplu normalment ikunu xierqa. Meta sseħħ ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin għandhom ikopru firxa minn dik iċ-ċitotossiċità produttiva sa konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossiċità moderata u baxxa jew ebda ċitotossiċità. Ħafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons weqfin u, biex tkun koperta l-medda sħiħa taċ-ċitotossiċità jew biex tiġi studjata r-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons fid-dettall, jaf ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjonijiet spazjati aktar qrib xulxin u aktar minn erba' konċentrazzjonijiet, speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 43). L-użu ta' aktar minn erba' konċentrazzjonijiet jista' jkun partikolarment importanti meta jintużaw kolturi individwali.

20. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilħaq bejn 20 u 10 % RS. Għandha tingħata attenzjoni meta jiġu interpretati riżultati pożittivi li jinsabu biss f'10 % RS jew anqas (il-paragrafu 43).

21. Għal sustanzi kimiċi tat-test ftit li xejn solubbli li mhumiex ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet anqas mill-anqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajnuna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossiċità sseħħ f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni waħda biss li tipproduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artefattwali mill-preċipitat. Fil-konċentrazzjoni li tipproduċi preċipitat, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekkilx it-twettiq tat-test. Id-determinazzjoni tas-solubbiltà fil-medium tat-tkabbir qabel l-esperiment tista' tkun utli.

22. Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossiċità li tillimita, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-anqas (39) (40). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa (jiġifieri Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli (UVCBs)) (41), estratti ambjentali, eċċ., il-konċentrazzjoni massima jaf ikollha bżonn tkun ogħla (eż. 5 mg/mL), fin-nuqqas ta' biżżejjed ċitotossiċità, biex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wieħed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (42).

Kontrolli

23. Għal kull kundizzjoni sperimentali għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 16) li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u mmaniġġjati bl-istess mod bħall-kolturi tat-trattament.

24. Kontrolli pożittivi konkorrenti huma meħtieġa biex juru l-ħila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' mutaġeni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat u l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena, meta applikabbli. Fit-tabella 1 ta' hawn taħt jingħataw xi eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll pożittiv oħra, jekk ikunu ġustifikati. Peress li t-testijiet *in vitro* fuq ċelloli tal-mammiferi għat-tossiċità ġenetika huma standardizzati biżżejjed, it-testijiet li jużaw trattament b'attivazzjoni metabolika esoġena u mingħajr jistgħu jitwettqu biss bl-użu ta' kontroll pożittiv li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. F'dan il-każ, dan ir-rispons tal-kontroll pożittiv individwali se juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll ir-responsività tas-sistema tat-test. Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'konċentrazzjoni waħda jew aktar li tkun mistennija tagħti żidiet riproduċibbli u individwabbli li jispikkaw biex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test, u r-rispons ma għandux ikun imxekkel miċ-ċitotossiċità li taqbeż il-limiti speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar (ara l-paragrafu 20).

Tabella 1

Sustanzi ta' riferiment rakkomandati għall-valutazzjoni tal-proficjenza tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi

Kundizzjoni tal-Attivazzjoni Metabolika	Lokus	Sustanza u Nru CAS
Assenza ta' attivazzjoni metabolika esoġena	*Hprt*	Etilmetansulfonat [Nru CAS 62-50-0] Etilnitrosourea [Nru CAS 759-73-9] 4-Nitrokinolina 1-ossidu [Nru CAS 56-57-5]
	xprt	Streptonigrina [Nru CAS 3930-19-6] Mitomiċina C [Nru CAS 50-07-7]
Preżenza ta' attivazzjoni metabolika esoġena	*Hprt*	3-Metilkolantren [Nru CAS 56-49-5] 7,12-Dimetilbenżantraċen [Nru CAS 57-97-6] Benżo[a]piren [Nru CAS 50-32-8]
	xprt	Benżo[a]piren [Nru CAS 50-32-8]

PROĊEDURA

Trattament bis-sustanza kimika tat-test

25. Iċ-ċelloli li jipproliferaw huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika. L-esponiment għandu jkun għal perjodu xieraq ta' żmien (normalment perjodu ta' bejn tlieta u sitt sigħat ikun adegwat).

26. In-numru minimu ta' ċelloli użati għal kull koltura tat-test (tal-kontroll u trattata) f'kull stadju fit-test għandu jkun ibbażat fuq il-frekwenza mutanti spontanja. Gwida ġenerali hi li jiġu ttrattati u passaġġati biżżejjed ċelloli biex jinżammu 10 mutanti spontanji f'kull koltura fil-fażijiet kollha tat-test (17). Il-frekwenza mutanti spontanja ġeneralment tkun ta' bejn 5 u 20 × 10-6. Għal frekwenza mutanti spontanja ta' 5 × 10-6 u biex jinżamm numru suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) anki għall-kolturi ttrattati b'konċentrazzjonijiet li jikkawżaw ċitotossiċità ta' 90 % matul it-trattament (10 % RS), ikun hemm bżonn li tal-anqas jiġu ttrattati 20 × 106 ċelloli. Barra minn hekk, numru suffiċjenti ta' ċelloli (iżda qatt anqas minn żewġ miljuni) iridu jiġu kolturati matul il-perjodu ta' espressjoni u pjastrati għall-għażla tal-mutanti (17).

Il-ħin tal-espressjoni fenotipika u l-kejl tal-frekwenza tal-mutanti

27. Wara l-perjodu tat-trattament, iċ-ċelloli jiġu kkolturati biex tkun tista' ssir l-espressjoni tal-fenotip tal-mutanti. Ġeneralment ikun biżżejjed minimu ta' bejn sebgħa u disat ijiem biex tkun tista' ssir espressjoni fenotipika kważi ottimali ta' mutanti Hprt u xprt indotti ġodda (43) (44). Matul dan il-perjodu, iċ-ċelloli jiġu subkolturati regolarment biex jinżammu fi stat ta' tkabbir esponenzjali. Wara l-espressjoni fenotipika, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu pjastrati f'medium b'aġent selettiv (6-tiogwanina) u mingħajr għad-determinazzjoni tan-numru ta' mutanti u tal-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla, rispettivament. Dan il-pjastrament jista' jitwettaq bl-użu ta' platti għall-kolturi monosaffi jew ta' mikropjastri għaċ-ċelloli f'sospensjoni. Għall-għażla tal-mutanti, iċ-ċelloli għandhom jiġu pjastrati f'densità tali li tiżgura rkupru ottimali tal-mutanti (jiġifieri tiġi evitata kooperazzjoni metabolika) (17). Il-pjastri jiġu inkubati għal tul xieraq ta' żmien għat-tkabbir ottimali tal-kolonja (eż. 7-12-il jum) u jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).

Proficjenza tal-laboratorju

28. Biex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza bit-test qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi pożittivi ta' riferiment li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti (tal-anqas waħda b'attivazzjoni metabolika u waħda mingħajr magħżula mis-sustanzi elenkati fit-Tabella 1) u diversi kontrolli negattivi (bl-użu ta' diversi solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontroll pożittiv u negattiv għandhom ikunu konsistenti mad-dokumentazzjoni. Dan mhuwiex applikabbli għal laboratorji li jkollhom esperjenza, jiġifieri li jkollhom bażi ta' *data* storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 30 sa 33.

29. Għażla ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv (ara t-Tabella 1 fil-paragrafu 25) għandha tiġi investigata fin-nuqqas u fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, biex tintwera l-proficjenza fl-iżvelar ta' sustanzi kimiċi mutaġeniċi, biex tiġi ddeterminata l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u biex tintwera l-adegwatezza tal-kundizzjonijiet tat-tkabbir taċ-ċelloli matul it-trattament, l-espressjoni fenotipika u l-għażla tal-mutanti u tal-proċeduri tal-għoti ta' punteġġ. Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi magħżulin biex jingħataw żidiet riproduċibbli u marbutin mal-konċentrazzjoni li jispikkaw biex jintwerew is-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test.

Data storika tal-kontroll

30. Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv,

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv (mhux trattat, solvent).

31. Meta għall-ewwel tinkiseb id-*data* għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu konsistenti mad-*data* tal-kontroll ippubblikata (22). Peress li tiżdied aktar *data* sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (17) (45) (46).

32. Il-bażi ta' *data* storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-anqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (47)), biex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u biex juru li l-metodoloġija hi "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (46). Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-*data* storika (jiġifieri kriterji għall-inklużjoni u l-esklużjoni ta' *data* fid-*data* storika u l-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (45).

33. Id-*data* ta' kontroll negattiv għandha tikkonsisti fi frekwenzi mutanti minn kolturi individwali jew idealment irreplikati kif deskritt fil-paragrafu 23. Idealment, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (17) (45) (46). Meta d-*data* tal-kontroll negattiv konkorrenti toħroġ mil-limitu ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll dment li din id-*data* ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara aktar 'il fuq) u jkun hemm evidenza ta' ebda żball tekniku jew uman.

34. Kwalunkwe tibdil fil-protokoll tal-esperimenti għandu jiġi kkunsidrat fid-dawl tal-konsistenza tiegħu mal-bażijiet ta' *data* tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' bażi ta' *data* storika ġdida tal-kontroll.

DATA U RAPPORTAR

Preżentazzjoni tar-riżultati

35. Il-preżentazzjoni tar-riżultati għandha tinkludi d-*data* kollha meħtieġa biex tiġi kkalkolata ċ-ċitotossiċità (espressa bħala RS). Id-*data*, kemm għal kolturi ttrattati kif ukoll għal dawk tal-kontroll, għandha tinkludi n-numru ta' ċelloli fi tmiem it-trattament, in-numru ta' ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, u l-għadd tal-kolonji (jew in-numru ta' bwejriet mingħajr kolonji għall-metodu tal-mikropjastri). L-RS għal kull koltura għandha tkun espressa bħala perċentwal relattiv għall-kontroll tas-solvent konkorrenti (irreferi għall-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

36. Il-preżentazzjoni tar-riżultati għandha tinkludi wkoll id-*data* kollha meħtieġa biex tiġi kkalkolata l-frekwenza mutanti. Id-*data* għall-kolturi ttrattati kif ukoll tal-kontroll għandha tinkludi: (1) in-numru ta' ċelloli pjastrati b'aġent selettiv u mingħajr (fil-mument li fih iċ-ċelloli jiġu pjastrati għall-għażla tal-mutanti), u (2) in-numru ta' kolonji magħduda (jew in-numru ta' bwejriet mingħajr kolonji għall-metodu tal-mikropjastri) mill-pjastri b'aġent selettiv u mingħajr. Il-frekwenza mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti (fil-pjastri b'aġent selettiv) ikkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni (mill-pjastri mingħajr aġent selettiv). Il-frekwenza mutanti għandha tiġi espressa bħala n-numru ta' ċelloli mutanti għal kull miljun ċellola vijabbli (irreferi għall-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

37. Għandha tiġi pprovduta *data* dwar il-koltura individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tinġabar taħt forma ta' tabella.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

38. L-aċċettazzjoni ta' test hi bbażata fuq il-kriterji li ġejjin:

— Il-kontroll negattiv konkorrenti jitqies aċċettabbli għaż-żieda fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 33.

— Il-kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 24) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv konkorrenti.

— Ġew ittestjati żewġ kundizzjonijiet sperimentali (jiġifieri b'attivazzjoni metabolika u mingħajr) sakemm wieħed ma jirriżultax f'riżultati pożittivi (ara l-paragrafu 25).

— Hemm numru adegwat ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet li huma analizzabbli (paragrafi 25, 26 u 19).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 20, 21 u 22.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

39. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva biċ-ċar jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati:

— tal-anqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,

— iż-żieda hi relatata mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 33).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi mutazzjonijiet ġenetiċi f'ċelloli kolturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (46) (48).

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali kollha eżaminati:

— l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,

— ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,

— ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 33).

Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet ġentiċi f'ċelloli kolturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test.

41. Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

42. F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq jew biex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-*data* għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. It-twettiq ta' speriment ripetut, possibilment bl-użu ta' kundizzjonijiet sperimentali modifikati (eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet, kundizzjonijiet oħra tal-attivazzjoni metabolika [jiġifieri konċentrazzjoni S9 jew oriġini S9]) jista' jkun siewi.

43. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi. Għaldaqstant, ir-rispons tas-sustanza kimika tat-test għandu jiġi konkluż bħala ekwivoku (interpretat bħala bl-istess probabbiltà li jkun pożittiv jew negattiv).

Rapport tat-test

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

Is-sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Is-solvent:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;

— il-perċentwal ta' solvent fil-medium tat-tkabbir finali.

Iċ-ċelloli:

Għal kolturi prinċipali tal-Laboratorju:

— it-tip, is-sors tal-linji ta' ċelloli;

— in-numru ta' passaġġi, jekk disponibbli, u l-istorja fil-laboratorju;

— il-karatteristiċi tal-karjotip u/jew in-numru modali tal-kromożomi;

— il-metodi għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli;

— l-assenza tal-mikoplażma;

— il-ħinijiet għall-irdoppjar taċ-ċelloli.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġuni prinċipali għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u l-għadd ta' kolturi inklużi, eż. *data* dwar iċ-ċitotossiċità u limitazzjonijiet tas-solubbiltà;

— il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni ta' CO_2, il-livell ta' umdità;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tat-tkabbir (eż. µg jew mg/ml jew mM tal-medium tat-tkabbir);

— il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) ta' solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tat-tkabbir;

— it-temperatura ta' inkubazzjoni;

— il-ħin ta' inkubazzjoni;

— id-durata tat-trattament;

— id-densità taċ-ċellula waqt it-trattament;

— it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-taħlita ta'
S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' taħlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tat-tkabbir finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9);

— is-sustanzi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali għal kull kundizzjoni tat-trattament;

— it-tul tal-perjodu ta' espressjoni (inkluż in-numru ta' ċelluli miżrugħa, u skedi ta' subkolturi u ta' tagħlif, jekk ikun xieraq);

— l-identità tal-aġent selettiv u l-konċentrazzjoni tiegħu;

— il-kriterji għall-aċċettabbiltà tat-testijiet;

— il-metodi użati biex jingħadd in-numru ta' ċelloli vijabbli u mutanti;

— il-metodi użati għall-kejl taċ-ċitotossiċità;

— kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossiċità u l-metodu użat;

— id-durata tal-ħinijiet ta' inkubazzjoni wara l-pjastrament;

— il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

— il-metodi użati biex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità u l-preċipitazzjoni.

Ir-riżultati:

— in-numru ta' ċelloli ttrattati u n-numru ta' ċelloli subkolturati għal kull koltura;

— il-kejlijiet taċ-ċitotossiċità u osservazzjonijiet oħra, jekk ikun hemm;

— is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-ħin tad-determinazzjoni;

— in-numru ta' ċelloli pjastrati f'medium selettiv u mhux selettiv;

— in-numru ta' kolonji f'medium mhux selettiv u n-numru ta' kolonji reżistenti f'medium selettiv, u l-frekwenzi mutanti relatati;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— id-*data* tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) konkorrenti;

— id-*data* storika tal-kontroll pożittiv u negattiv (solvent), bil-meded, bil-medji u bid-dejvazzjonijiet standard u bl-intervall ta' kunfidenza (eż. 95 %) kif ukoll bin-numru tad-*data*;

— analiżijiet statistiċi (għal kolturi individwali u għal repliki raggruppati jekk xieraq), u l-valuri p jekk ikun hemm.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariġi.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. u Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

(3) Chu E.H.Y. u Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro* , Proc. Natl. Acad. Sci. Sci., L-Istati Uniti, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. u Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. u Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, Mutation Res. Mutation Res.,223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. u Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res. Mutation Res.,312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. u Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. u Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. u Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. u Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. u Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., u Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. u Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. u Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. u Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. u Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., u Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., u Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., u Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Il-manuskritt għadu qed jitħejja).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. u Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. u Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. u de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. u Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. u Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. u Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. u Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. u Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Fi: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. u Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. u Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol.*, 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. u Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) UNEP. (2001). Il-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes, Programm tan-Nazzjonijiet Uniti għall-Ambjent (UNEP). Disponibbli fuq: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. u Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. u McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Fi: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91–103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. u Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Linji Gwida tat-Test 473, 476 u 487). Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi.

(40) Brookmire L., Chen J.J. u Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Disponibbli fuq: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. u Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., u Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., u Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., u Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., u Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Mutaġeni li jissostitwixxu l-koppji tal-bażijiet: sustanzi kimiċi li jikkawżaw sostituzzjoni tal-koppji tal-bażijiet fid-DNA.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Effiċjenza tal-klonazzjoni: Il-perċentwal ta' ċelloli pjastrati f'densità baxxa li kapaċi jikbru f'kolonja li tista' tingħadd.

Konċentrazzjonijiet: irreferi għall-konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tat-tkabbir

Ċitotossiċità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar, iċ-ċitotossiċità hi identifikata bħala tnaqqis fis-sopravivenza relattiva taċ-ċelloli ttrattati meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu speċifiku).

Mutazzjoni 'l quddiem: mutazzjoni ta' ġene mit-tip parentali għall-forma mutanti li tkun toħloq alterazzjoni jew telf tal-attività enzimatika jew tal-funzjoni tal-proteina kodifikata.

Mutaġeni li jibdlu l-qari tal-kodiċi ġenetiku: sustanzi kimiċi li jikkawżaw iż-żieda jew it-tħassir ta' koppji tal-bażijiet individwali jew multipli fil-molekula tad-DNA.

Ġenotossiċi: terminu ġenerali li jinkludi kull tip ta' ħsara fid-DNA jew kromożomika, inkluż ksur tad-DNA, addotti, riarranġamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew fi ħsara kromożomika stabbli.

Medium tal-HAT: medium li fih l-Ipoksantina, l-Aminopterina u t-Timidina, użat għat-tindif tal-mutanti Hprt.

Rikombinament mitotiku: matul il-mitożi, ir-rikombinament bejn kromatidi omologi li possibilment jirriżulta fl-induzzjoni ta' ksur tal-ħajta doppja tad-DNA jew f'telf ta' eterożigożità.

Medium tal-MPA:: medium li fih il-Ksantina, l-Adenina, it-Timidina, l-Aminopterina u l-aċidu Mikofenoliku, użat għat-tindif tal-mutanti Xprt.

Mutaġeniċi: jipproduċu tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA fil-ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Frekwenza mutanti (MF): in-numru ta' kolonji mutanti osservati diviż bin-numru ta' ċelloli pjastrati f'medium selettiv, ikkoreġut għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (jew il-vijabbiltà) fil-mument tal-għażla.

Ħin tal-espressjoni fenotipika: Il-ħin wara t-trattament li matulu l-alterazzjoni ġenetika tkun fissa fi ħdan il-ġenom u kwalunkwe prodott tal-ġeni preeżistenti jitbattal sal-punt li l-karatteristika fenotipika tinbidel.

Sopravivenza relattiva (RS): RS tintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossiċità relatata mat-trattament. RS hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %).

Frazzjoni tal-fwied S9: supernatant ta' omoġenat tal-fwied wara ċentrifugazzjoni ta' 9 000g, jiġifieri estratt minn fwied mhux proċessat

Taħlita ta' S9: taħlita tal-frazzjoni tal-fwied S9 u tal-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metaboliċi.

Kontrolli tas-solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kolturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent waħdu użat biex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Kontroll mhux trattat: kolturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri la sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu pproċessati fl-istess ħin u bl-istess mod bħall-kolturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

UVCB: Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti jew Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

Appendiċi 2

FORMULI GĦALL-VALUTAZZJONI TAĊ-ĊITOTOSSIĊITÀ U TAL-FREKWENZA MUTANTI

Iċ-ċitotossiċità tiġi evalwata bis-sopravivenza relattiva, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni aġġustata f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (ara l-formula tal-RS aktar 'il quddiem).

Is-CE aġġustata għal koltura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$\text{CE aġġustata} = \frac{\text{Numru ta' ċelloli fi tmiem it} - \text{trattament}}{\text{Numru ta' ċelloli fil} - \text{bidu tat} - \text{trattament}}$$

RS aġġustata għal koltura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$\text{RS} = \frac{\text{CE aġġustata fil — koltura trattata}}{\text{Adjusted CE aġġustata fil} - \text{kontroll b'solvent}} \times 100$$

Il-frekwenza mutanti hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kolonji mutanti f'medium selettiv diviża bl-effiċjenza tal-klonazzjoni f'medium mhux selettiv imkejla għall-istess koltura fil-ħin tal-għażla.

$$\text{Frekwenza mutanti} = \frac{\text{Effiċjenza tal — klonazzjoni tal — kolonji mutanti f'medium selettiv}}{\text{Effiċjenza tal — klonazzjoni f'medium mhux selettiv}}$$

Meta l-pjastri jintużaw għall-effiċjenza tal-klonazzjoni:

CE = Numru ta' kolonji / Numbru ta' ċelloli pjastrati.

Meta l-mikropjastri jintużaw għall-effiċjenza tal-klonazzjoni:

In-numru ta' kolonji għal kull bwejra fil-mikropjastri jsegwi distribuzzjoni ta' Poisson.

Effiċjenza tal-Klonazzjoni = -LnP(0) / Numru ta' ċelloli pjastrati għal kull bwejra

Fejn -LnP(0) hu n-numru probabbli ta' bwejriet vojta mill-bwejriet miżrugħa u hu deskritt bil-formula li ġejja

LnP(0)= -Ln (numru ta' bwejriet vojta / numru ta' bwejriet pjastrati)"

(3) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.22 hu ssostitwit b'dan li ġej:

"B.22 **TEST LETALI DOMINANTI TAR-RODITURI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 478 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu u tal-kunsiderazzjonijiet relatati mat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni modifikata tal-metodu ta' ttestjar tirrifletti aktar minn tletin sena esperjenza b'dan it-test u l-potenzjal għall-integrazzjoni jew għall-kombinament ta' dan it-test ma' testijiet oħra tat-tossiċità bħal studji dwar it-tossiċità fl-iżvilupp jew riproduttiva, jew dwar il-ġenotossiċità; madankollu, minħabba l-limitazzjonijiet tiegħu u l-użu ta' numru kbir ta' annimali, dan l-assaġġ mhuwiex maħsub biex jintuża bħala metodu primarju, iżda aktar bħala metodu ta' ttestjar supplimentari li jista' jintuża biss meta ma jkun hemm ebda alternattiva għar-rekwiżiti regolatorji. Il-kombinament tal-ittestjar tat-tossiċità għandu l-potenzjal li jiffranka numri kbar ta' annimali mill-użu fit-testijiet tat-tossiċità. L-OECD żviluppa dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (1).

2. L-iskop tat-test Letali Dominanti (DL) hu li jinvestiga jekk is-sustanzi kimiċi jipproduċux mutazzjonijiet li jirriżultaw minn aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli ġerminali. Barra minn hekk, it-test letali dominanti hu rilevanti għall-valutazzjoni tal-ġenotossiċità għaliex, għalkemm jistgu jvarjaw bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetika u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-rispons. L-induzzjoni ta' mutazzjoni DL wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test tindika li s-sustanza kimika affettwat it-tessut ġerminali tal-annimal tat-test.

3. Il-mutazzjonijiet tad-DL jikkawżaw mewt embrijoniku jew tal-fetu. L-induzzjoni ta' mutazzjoni DL wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test tindika li s-sustanza kimika affettwat iċ-ċelloli ġerminali tal-annimal tat-test.

4. Assaġġ tad-DL hu siewi għall-konferma ta' riżultati pożittivi ta' testijiet bl-użu ta' punti ta' tmiem somatiċi *in vivo*, u hu punt ta' tmiem rilevanti għat-tbassir tal-periklu għall-bniedem u tar-riskju ta' mardiet ġenetiċi trażmessi permezz tal-linja ġerminali. Madankollu, dan l-assaġġ jeħtieġ numru kbir ta' annimali u jinvolvi xogħol intensiv; għaldaqstant, hu għali ħafna u jieħu ż-żmien biex isir. Minħabba li l-frekwenza spontanja tal-mutazzjonijiet letali dominanti hi kemxejn għolja, is-sensittività tal-assaġġ għad-detezzjoni ta' żidiet żgħar fil-frekwenza tal-mutazzjonijiet ġeneralment tkun limitata.

5. Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

6. It-test isir l-aktar bil-ġrieden (2) (3) (4) iżda f'ċerti każijiet jistgħu jkunu xierqa speċijiet oħra, bħall-firien (5) (6) (7) (8), jekk ikunu xjentifikament ġustifikati. Id-DLs ġeneralment ikunu r-riżultat ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi kbar (anormalitajiet strutturali u numeriċi) (9) (10) (11), iżda mutazzjonijiet tal-ġeni ma jistgħux ikunu eskluży. Mutazzjoni tad-DL hi mutazzjoni li sseħħ f'ċellola ġerminali minnha nfisha, jew tiġi ffissata wara l-fertilizzazzjoni fl-embrijun bikri, li ma tikkawżax disfunzjoni tal-gamet, iżda hi letali għall-bajda fertilizzata jew għall-embrijun li jkun qed jiżviluppa.

7. L-irġiel individwali jitgħammru b'mod sekwenzjali ma' nisa verġni f'intervalli xierqa. In-numru ta' drabi li jitgħammru wara t-trattament jiddependi mill-iskop finali tal-istudju tad-DL (Paragrafu 23) u għandu jiżgura li l-fażijiet kollha tal-maturazzjoni taċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel jiġu evalwati għad-DLs (12).

8. Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, ma jkunux se jilħqu t-testikoli, ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

9. Ġeneralment, l-annimali rġiel jiġu esposti għal sustanza kimika tat-test b'rotta ta' esponiment xierqa u jitgħammru ma' nisa verġni mhux trattati. Tipi differenti ta' ċelloli ġerminali jistgħu jiġu ttestjati bl-użu ta' intervalli ta' tgħammir sekwenzjali. Wara t-tgħammir, in-nisa jiġu ewtanizzati wara perjodu ta' żmien xieraq, u l-utri tagħhom jiġu eżaminati biex jiġu determinati n-numri ta' impjanti u ta' embrijuni ħajjin u mejtin. Il-letalità dominanti ta' sustanza kimika tat-test hi determinata bit-tqabbil tal-impjanti ħajjin għal kull mara fil-grupp trattat mal-impjanti ħajjin għal kull mara fil-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent. Iż-żieda fl-impjanti mejtin f'kull waħda tas-sess femminil fil-grupp trattat diviż bin-numru ta' impjanti mejtin f'kull waħda tas-sess femminil fil-grupp tal-kontroll turi t-telf ta' wara l-impjantazzjoni indott mis-sustanza kimika tat-test. It-telf ta' wara l-impjantazzjoni jiġi kkalkolat bid-determinazzjoni tal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp tal-kontroll. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni tista' tkun stimata billi jitqabbel l-għadd ta' *corpora lutea* nieqes l-impjanti totali jew l-impjanti totali għal kull mara fil-gruppi trattati u tal-kontroll.

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

10. Il-kompetenza f'dan l-assaġġ għandha tiġi stabbilita billi tintwera l-ħila li jiġu rirpodotti frekwenzi letali dominanti minn *data* ppubblikata (eż. (13) (14) (15) (16) (17) (18)) b'sustanzi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfa) bħal dawk elenkati fit-Tabella 1, u b'kontrolli bil-veikoli u billi jinkisbu frekwenzi tal-kontroll negattiv li jkunu medda aċċettabbli konssitenti ta' *data* (ara r-referenzi aktar 'il fuq) jew bid-distribuzzjoni storika tal-kontroll tal-laboratorju, jekk disponibbli.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

11. Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali sesswalment maturi f'saħħithom. Il-ġrieden jintużaw spiss iżda l-firien jistgħu jkunu adattati wkoll. Tista' tintuża kwalunkwe speċi ta' mammiferi xierqa oħra, jekk tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika fir-rapport.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali

12. Għar-rodituri, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). Għalkemm idealment l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun ta' tal-anqas 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, segwita minn 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Qabel it-trattament jew it-tgħammir, ir-rodituri għandhom jinżammu fi gruppi żgħar (mhux aktar minn ħamsa) tal-istess sess jekk ma tkun mistennija jew osservata ebda mġiba aggressiva, idealment f'gaġeġ solidi b'arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat.

Preparazzjoni tal-annimali

13. L-annimali adulti rġiel u nisa f'saħħithom u sesswalment maturi jkunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu uman u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikroċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fis-swaba' u fil-widnejn) u jitħallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-anqas ħamest ijiem. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u mis-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx ± l-20 % tal-piż medju ta' kull sess.

Preparazzjoni tad-doża

14. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi jew f'veikoli xierqa jew jitħalltu f'dieta jew f'ilma tax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għall-esponimenti bit-teħid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

Kundizzjonijiet tat-test

Solvent/veikolu

15. Is-solvent/il-veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-volumi tad-doża użati, u ma għandux ikun suspettat li joħloq reazzjoni kimika mas-sustanza kimika tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħra li ma jkunux magħrufa sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' *data ta'* riferiment li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Hu rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu l-ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetil, żejt taż-żebbuġa u żejt tal-qamħirrum.

Kontrolli pożittivi

16. Dejjem għandhom jintużaw annimali tal-kontroll pożittiv konkorrenti sakemm il-laboratorju ma jkunx wera profiċjenza fit-twettiq tat-test u jkun uża t-test bħala rutina fl-imgħoddi riċenti (eż. matul l-aħħar ħames snin). Madankollu, ma hemmx bżonn li l-annimali tal-kontroll pożittiv jiġu ttrattati bl-istess rotta bħall-annimali li jirċievu s-sustanza kimika tat-test, jew li jiġu kampjunati l-intervalli tat-tgħammir kollha. Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom ikunu magħrufa li jipproduċu DLs bil-kundizzjonijiet użati għat-test. Ħlief għat-trattament, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom ikunu maniġġati b'mod identiku bħall-annimali fil-gruppi trattati.

17. Id-doża tas-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom jintgħażlu biex jipproduċu effetti dgħajfa jew moderati li jivvalutaw b'mod kritiku l-prestazzjoni u s-sensittività tal-assaġġ, iżda li konsistentement jipproduċu effetti letali dominanti pożittivi. Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv u tad-doża xierqa.

Tabella 1

Eżempji ta' Sustanzi tal-Kontroll Pożittiv

Sustanza [Nru CAS] (nru ta' riferiment)	Medda tad-Doża Effettiva (mg/kg) (speċi tar-rodituri)	Żmien tal-Amministrazzjoni (jiem)
Trietilenmelamina [51-18-3] (15)	0,25 (ġrieden)	1
Ċiklofosfammid [50-18-0] (19)	50-150 (ġrieden)	5
Ċiklofosfammid [50-18-0] (5)	25-100 (firien)	1
Metansulfonat tal-etil [62-50-0] (13)	100-300 (ġrieden)	5
Akrilammid Monomeriku [79-06-1] (17)	50 (ġrieden)	5
Klorambusil [305-03-3] (14)	25 (ġrieden)	1

Kontrolli negattivi

18. L-annimali tal-kontrolli negattivi, trattati b'solvent jew b'veikolu waħdu, u mill-bqija trattati bl-istess mod bħall-gruppi tal-kura, għandhom ikunu inklużi għal kull ħin tal-kampjunar (20). Fin-nuqqas ta' *data* tal-kontroll storika jew ippubblikata li turi li ma kien indott ebda DL jew effett ta' tħassir ieħor mis-solvent/mill-veikolu magħżul, l-annimali tal-kontroll mhux trattati għandhom ikunu inklużi wkoll għal kull ħin tal-kampjunar biex tiġi stabbilita aċċettabbiltà tal-kontroll tal-veikolu.

PROĊEDURA

Għadd ta' Annimali

19. L-irġiel individwali jitgħammru b'mod sekwenzjali f'intervalli predeterminati xierqa (eż. intervalli ta' kull ġimgħa, Paragrafi 21 u 23), idealment ma' mara verġni waħda. L-għadd ta' rġiel għal kull grupp għandu jkun predeterminat biex ikun biżżejjed (flimkien man-numru ta' nisa mgħammra f'kull intervall ta' tgħammir) biex tiġi pprovduta s-saħħa statistika neċessarja biex tal-anqas jiġi individwat irdoppjar tal-frekwenza tad-DL (Paragrafu 44).

20. L-għadd ta' nisa għal kull intervall ta' tgħammir ukoll għandu jkun predeterminat mill-kalkoli tas-saħħa statistika biex tal-anqas ikun jista' jiġi individwat irdoppjar fil-frekwenza tad-DL (jiġifieri biżżejjed nisa tqal biex jipprovdu tal-anqas 400 impjant totali) (20) (21) (22) (23) u li tal-anqas ikun mistenni impjant mejjet wieħed għal kull unità ta' analiżi (jiġifieri grupp ta' tgħammir għal kull doża) (24).

Perjodu ta' Amministrazzjoni u l-Intervalli ta' Tgħammir

21. L-għadd ta' intervalli ta' tgħammir wara t-trattament hu regolat bl-iskeda tat-trattament u għandu jiżgura li l-fażijiet kollha ta' maturazzjoni taċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel jiġu evalwati għall-induzzjoni tad-DL (12) (25). Għal trattament wieħed sa ħames amministrazzjonijiet tad-doża kuljum, għandu jkun hemm tmien istanzi ta' tgħammir (ġrieden) jew 10 (firien) imwettqa f'intervalli ta' kull ġimgħa wara l-aħħar trattament. Għal amministrazzjoni b'doża multipla, l-għadd ta' intervalli ta' tgħammir jista' jitnaqqas b'mod proporzjonat għaż-żmien miżjud tal-perjodu ta' amministrazzjoni, iżda jinżamm l-għan ta' evalwazzjoni tal-fażijiet kollha ta' spermatoġenesi (eż. wara esponiment għal 28 jum, erba' istanzi ta' tgħammir fil-ġimgħa biss ikunu biżżejjed biex jiġu evalwati l-fażijiet kollha tal-ispermatoġenesi fil-ġurdien). L-iskedi kollha ta' trattament u ta' tgħammir għandhom ikunu xjentifikament ġustifikati.

22. In-nisa għandhom jibqgħu mal-irġiel tal-anqas għad-durata ta' ċiklu estruż wieħed (eż. ġimgħa tkopri ċiklu estruż wieħed fil-ġrieden kif ukoll fil-firien). In-nisa li ma jitgħammrux matul intervall ta' ġimgħa jistgħu jintużaw għal intervall sussegwenti ta' tgħammir. Inkella, sakemm iseħħ it-tgħammir, kif determinat mill-preżenza ta' sperma fil-vaġina jew mill-preżenza ta' tapp vaġinali.

23. Ir-reġimen ta' esponiment u ta' tgħammir użat jiddependi mill-iskop finali tal-istudju tad-DL. Jekk l-għan hu li jiġi determinat jekk sustanza kimika partikolari tinduċix mutazzjonijiet tad-DL *per se*, il-metodu aċċettat ikun li tiġi esposta serje sħiħa ta' spermatoġenesi (eż. seba' ġimgħat fil-ġurdien, minn ħamsa sa sebgħa trattamenti fil-ġimgħa) u tgħammir ta' darba fl-aħħar. Madankollu, jekk l-għan hu li jiġi identifikat it-tip ta' ċellola ġerminali sensittiva għall-induzzjoni tad-DL, ikun preferut esponiment ta' darba jew fuq ħames jiem segwit minn tgħammir darba fil-ġimgħa.

Livelli tad-doża

24. Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda *data* xierqa diġà disponibbli biex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jridu jintużaw fl-istudju ewlieni (26). L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala l-ogħla doża li tiġi tollerata mingħajr evidenza ta' tossiċità li tillimita l-istudju, b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, imġiba jew reazzjonijiet anormali, dipressjoni minuri tal-piż tal-ġisem jew ċitotossiċità tas-sistema ematopoetika), iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigħ, ta' tbatija jew ta' diffikultà li jeħtieġu ewtanażja umanitarja (27).

25. L-MTD lanqas ma tista' taffettwa b'mod avvers is-suċċess tat-tgħammir (21).

26. Is-sustanzi kimiċi tat-test b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi mhux tossiċi baxxi (bħal ormoni u mitoġeni), u sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni ta' proprjetajiet tossikokinetiċi jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' tfassil tad-doża u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

27. Biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju sħiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv u tal-anqas tliet livelli ta' doża ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda mhux akbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċix tossiċità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-*data* eżistenti, l-ogħla doża għal amministrazzjoni waħda għandha tkun ta' 2 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tossiċità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom idealment ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew ebda tossiċità. Għal sustanzi kimiċi mhux tossiċi, id-doża limitu għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew aktar hi ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, u għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' anqas minn 14-il jum id-doża limitu hi ta' 2 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum.

Amministrazzjoni tad-Doża

28. Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħażlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja, fil-vini, bit-teħid man-nifs, orali (b'gavage), jew b'impjantazzjoni, kif ġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħażel biex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Normalment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li ma tkunx rotta intiża ta' esponiment tal-bniedem, u għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew l-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wieħed, wieħed għandu joqgħod attent li l-ħin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u t-tgħammir ikun biżżejjed biex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (paragrafu 31). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew b'injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun ta' aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża massimu ta' 2 ml/100 g. L-użu ta' volumi akbar minn dan (jekk ikunu permessi mil-leġiżlazzjoni dwar it-trattament xieraq tal-annimali) għandu jkun iġġustifikat. Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

Osservazzjonijiet

29. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrin jidhru l-aktar l-effetti antiċipati. Tal-inqas darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' dożaġġ, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għall-morbidità u għall-mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju u tal-anqas darba fil-ġimgħa matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-ħin tal-ewtanażja. Il-kejlijiet tal-konsum tal-ikel għandu jsir tal-anqas darba kull ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-anqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanizzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (27).

Ġbir u Proċessar tat-Tessuti

30. In-nisa jiġu ewtanizzati fit-tieni nofs tat-tqala fil-jum tal-ġestazzjoni (GD), 13 għall-ġrieden u GD 14-15 għall-firien. L-utri jiġu eżaminati għal effetti letali dominanti biex jiġi determinat in-numru ta' impjanti, ta' embrijuni ħajjin u mejtin, u ta' *corpora lutea*.

31. Il-qrejjen tal-utru u l-ovarji jiġu esposti għall-għadd tal-*corpora lutea*, u l-feti jitneħħew, jingħaddu u jintiżnu. Għandha tingħata attenzjoni biex l-utri jiġu eżaminati għal riassorbimenti oskurati minn feti ħajjin u biex jiġi żgurat li r-riassorbimenti kollha jiġu enumerati. Tiġi reġistrata l-mortalità tal-feti. In-numru ta' nisa mtaqqla b'suċċess u n-numru ta' impjantazzjonijiet totali, it-telf qabel l-impjantazzjoni, u l-mortalità ta' wara l-impjantazzjoni (inklużi r-riassorbimenti bikrin u tardivi) jiġu reġistrati wkoll. Barra minn hekk, il-feti viżibbli jistgħu jiġu preservati fil-fissattiv ta' Bouin għal tal-anqas ġimagħtejn (2) u mbagħad jiġu eżaminati għal malformazzjonijiet esterni maġġuri (28) biex tiġi pprovduta informazzjoni addizzjonali dwar l-effetti riproduttivi u fuq l-iżvilupp tal-aġent tat-test.

DATA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

32. Id-*data* għandha tkun fil-forma ta' tabelli biex turi n-numru ta' annimali rġiel mgħammra, in-numru ta' nisa tqal, u n-numru ta' nisa li mhumiex tqal. Ir-riżultati ta' kull tgħammir, inkluża l-identità ta' kull raġel u mara għandhom ikunu rrapportati b'mod individwali. L-intervall tat-tgħammir, il-livell tad-doża għall-irġiel ittrattati, u n-numri ta' impjanti ħajjin u ta' impjanti mejtin għandhom jiġu enumerati għal kull mara.

33. It-telf ta' wara l-impjantazzjoni jiġi kkalkolat bid-determinazzjoni tal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali mill-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjantazzjonijiet totali mill-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent.

34. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni hu kkalkolat bħala d-differenza bejn in-numru ta' *corpora lutea* u n-numru ta' impjanti jew bħala tnaqqis fin-numru medju ta' impjanti għal kull mara meta mqabbel mat-tgħammir tal-kontroll. Meta jkun stimat it-telf ta' qabel l-impjantazzjoni, għandu jkun irrapportat.

35. Il-fattur Letali Dominanti jiġi stmat bħala: (l-imwiet ta' wara l-impjantazzjoni/l-impjantazzjonijiet totali għal kull mara) × 100.

36. Għandha tiġi rrapportata d-*data* dwar it-tossiċità u s-sinjali kliniċi (skont il-Paragrafu 29).

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

37. Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabbiltà ta' test.

— Il-kontroll negattiv konkorrenti hu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll negattiv, u mad-*data* storika tal-kontroll tal-laboratorju jekk tkun disponibbli (ara l-Paragrafi 10 u 18).

— Il-kontrolli pożittivi konkorrenti jinduċu risponsi li jkunu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll pożittiv, jew mal-bażi tad-*data* storika tal-kontroll pożittiv tal-laboratorju, jekk disponibbli, u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-Paragrafi 17 u 18).

— Ġew analizzati numru adegwat ta' impjanti totali u dożi (Paragrafu 20).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-Paragrafi 24 u 27.

Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

38. Tal-anqas tliet gruppi tad-doża kkurati għandhom jiġu analizzati biex tiġi pprovduta biżżejjed *data* għal analiżi tar-rispons għad-doża.

39. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva biċ-ċar jekk:

— tal-anqas waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;

— iż-żieda tkun relatata mad-doża f'tal-anqas kundizzjoni sperimentali waħda (eż. intervall tat-tgħammir ta' kull ġimgħa) meta evalwata b'test xieraq; u,

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mill-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson) jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li kapaċi tinduċi mutazzjonijiet letali dominanti fiċ-ċelloli ġerminali tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa huma deskritti fil-Paragrafu 44; approċċi statistiċi rakkomandati oħra jistgħu jinstabu fid-dokumentazzjoni (20) (21) (22) (24) (29). It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal bħala l-unità sperimentali.

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva biċ-ċar jekk:

— l-ebda waħda mid-dożi tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;

— ma jkun hemm ebda żieda relatata mad-doża f'xi kundizzjoni sperimentali; u

— ir-riżultati kollha jaqgħu fi ħdan il-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson), jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li ma tkunx kapaċi tinduċi mutazzjonijiet letali dominanti fiċ-ċelloli ġerminali tal-annimali tat-test.

41. Ma hemm l-ebda ħtieġa għal verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

42. Jekk ir-rispons ma jkunx negattiv jew pożittiv b'mod ċar, u bħala għajnuna għall-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda dgħajfa jew ambigwa), id-*data* għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri li jużaw id-*data* sperimentali eżistenti, bħal kunsiderazzjoni ta' jekk ir-riżultat pożittiv jaqax barra mill-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll negattiv, jew ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (30).

43. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u għaldaqstant jiġi konklużż bħala ekwivoku.

44. It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal raġel bħala l-unità sperimentali. Filwaqt li hu possibbli li d-*data* dwar l-għadd (eż. in-numru ta' impjanti għal kull mara) tista' tkun distribwita skont Poisson u/jew il-proporzjonijiet (eż. il-proporzjon ta' impjanti mejtin) jistgħu jkunu distribwiti b'mod binomjali, spiss ikun il-każ li t-tali *data* tkun mifruxa wisq (31). Għaldaqstant, l-ewwel l-analiżi statistika għandha tuża test għal dispersjoni eċċessiva jew subottimali billi tuża testijiet tal-varjanza bħat-test tal-varjanza binomjali ta' Cochran (32) jew it-test C(α) ta' Tarone għad-dispersjoni binomjali eċċessiva (31) (33). Jekk ma jiġi individwat ebda tbegħid mid-dispersjoni binomjali, it-tendenzi fil-proporzjonijiet bejn il-livelli tad-doża jistgħu jiġu ttestjati bl-użu tat-test tat-tendenzi ta' Cochran-Armitage (34) u l-paraguni fil-livell tal-pari mal-grupp tal-kontroll jistgħu jiġu ttestjati bl-użu tat-test eżatt ta' Fisher (35). Bl-istess mod, jekk ma jiġi individwat ebda tbegħid mid-dispersjoni ta' Poisson, it-tendenzi fl-għadd jistgħu jiġu ttestjati bl-użu tar-rigressjoni ta' Poisson (36) u l-paraguni fil-livell tal-pari mal-grupp tal-kontroll jistgħu jiġu ttestjati fi ħdan il-kuntest tal-mudell Poisson, bl-użu tal-kuntrasti bejn il-pari (36). Jekk tiġi individwata dispersjoni eċċessiva jew subottimali, huma rakkomandati metodi mhux parametriċi (23) (31). Dawn jinkludu testijiet ibbażati fuq il-klassifikazzjonijiet, bħat-test Jonckheere-Terpstra għat-tendenza (37) u t-testijiet Mann-Whitney (38) għall-paraguni bejn il-pari mal-grupp tal-kontroll bil-veikolu/bis-solvent, kif ukoll it-testijiet tal-permutazzjoni, tal-kampjunar mill-ġdid, jew bootstrap għall-paraguni tat-tendenzi u bejn il-pari mal-grupp tal-kontroll (31) (39).

45. Assaġġ tad-DL pożittiv jipprovdi evidenza għall-ġenotossiċità tas-sustanza kimika tat-test fiċ-ċelloli ġerminali tar-raġel trattati tal-ispeċi tat-test.

46. Kunsiderazzjoni ta' jekk il-valuri osservati humiex fi ħdan jew barra l-medda ta' kontroll storiku tista' tipprovdi gwida meta tiġi evalwata s-sinifikanza bijoloġika tar-rispons (40).

Rapport tat-Test

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

Sommarju.

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

— il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-teħid man-nifs;

— id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż. l-istabbiltà, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

L-annimali tat-test:

— l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla,

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-metodu tal-identifikazzjoni unika tal-annimali;

— għal studji fuq terminu qasir: il-piż tal-ġisem individwali tal-annimali rġiel fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— *data* tal-kontrolli pożittivi u negattivi (veikolu/solvent);

— *data* mill-istudju ta' sejbien tal-medda,

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni;

— metodi għall-kejl tat-tossiċità tal-annimali, inklużi, fejn disponibbli, l-analiżijiet istopatoloġiċi jew ematoloġiċi u l-frekwenza li biha saru l-osservazzjonijiet u ttieħdu l-piżijiet tal-ġisem tal-annimali;

— il-metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laħqet it-tessut fil-mira, jew iċ-ċirkolazzjoni ġenerali, jekk jinkisbu riżultati negattivi;

— id-doża proprja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— dettalji dwar l-arrikkiment tal-ambjent tal-gaġeġ;

— deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet;

— il-metodu tal-analġeżija;

— il-metodu tal-ewtanażja;

— il-proċeduri għall-iżolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;

— is-sors u n-numri tal-lott tal-kitts u tar-reaġenti kollha (fejn applikabbli);

— il-metodi għall-enumerazzjoni tad-DLs;

— l-iskeda tat-tgħammir;

— il-metodi użati biex ikun determinat li seħħ it-tgħammir;

— il-ħin tal-ewtanażja;

— il-kriterji għall-għoti ta' punteġġ lill-effetti tad-DL, inklużi l-*corpora lutea*, l-impjantazzjonijiet, ir-riassorbimenti u t-telf ta' qabel l-impjantazzjoni, l-impjanti ħajjin, l-impjanti mejta.

Ir-riżultati:

— il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;

— il-piż tal-ġisem tal-irġiel matul il-perjodi tat-trattament u tat-tgħammir;

— in-numru ta' nisa mgħammra;

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;

— id-*data* konkorrenti u storika tal-kontroll negattiv bil-meded, bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;

— id-*data* konkorrenti tal-kontroll pożittiv;

— id-*data* f'tabelli għal kull omm inklużi: in-numru ta' *corpora lutea* għal kull omm; in-numru ta' impjantazzjonijiet għal kull omm; in-numru ta' riassorbimenti u ta' telf ta' qabel l-impjantazzjoni għal kull omm; in-numru ta' impjanti ħajjin għal kull omm; in-numru ta' impjanti mejtin għal kull omm; il-piżijiet tal-feti;

— id-*data* ta' hawn fuq miġbura għal kull perjodu ta' tgħammir u doża, bil-frekwenzi Letali Dominanti;

— l-analiżijiet u l-metodi statistiċi applikati.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjoni.

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariġi.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, f'Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., u Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant" lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol.,* 39, 173-185

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. u Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. u Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. u Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. u Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., u Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. u Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. u Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., u Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. u Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. u Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. u Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. u Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. u Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. u Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. u Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. u Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. u Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. u Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol.*, 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. u Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., u Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. u Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.19.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J u Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. u Thybaud V. (2011). "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. u ishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417-451.

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. F'*Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. u Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman u Hall, Londra (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. u Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, il-Kapitli 14 u 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

Corpora lutea (*lutea*): l-istruttura tas-sekrezzjoni ormonali fformata fuq l-ovarju fis-sit ta' follikolu li jkun ħeles il-bajda. In-numru ta' *corpora lutea* fl-ovarji jikkorrispondi għan-numru ta' bajd li ġew ovulati.

Mutazzjoni Letali Dominanti: mutazzjoni li sseħħ f'ċellola ġerminali, jew li tiġi fissa wara l-fertilizzazzjoni, li tikkawża mewta embrijonika jew fetali.

Rata ta' fertilità: in-numru ta' nisa tqal mgħammra fuq in-numru ta' nisa mgħammra.

Intervall tat-tgħammir: il-ħin bejn tmiem l-esponiment u t-tgħammir tal-irġiel trattati. Bil-kontroll ta' dan l-intervall, ikunu jistgħu jiġu vvalutati l-effetti kimiċi fuq it-tipi differenti ta' ċelloli ġerminali. Fit-tgħammir tal-ġrieden matul il-ġimgħat numru 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 wara tmiem l-esponiment ikejjel l-effetti fl-isperma, fl-ispermatidi kondensi, fl-ispermatidi tondi, fl-ispermatoċiti pakiten, fl-ispermatoċiti bikrin, fl-ispermatogonji differenzjati, fl-ispermatogonji tad-differenzazzjoni u fl-ispermatogonji taċ-ċelloli staminali.

Telf ta' qabel l-impjantazzjoni: id-differenza bejn in-numru ta' impjanti u n-numru ta' *corpora lutea*. Dan jista' jiġi stmat ukoll billi jitqabblu l-impjanti totali għal kull mara fil-grupp trattat u fil-grupp tal-kontroll.

Telf ta' wara l-impjantazzjoni: il-proporzjon tal-impjanti mejtin fil-grupp trattat meta mqabbel mal-proporzjon tal-impjanti mejtin għall-impjanti totali fil-grupp tal-kontroll.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanza Kimika b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti u Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

Appendiċi 2

TWAQQIT TAL-ISPERMATOĠENESI FIL-MAMMIFERI

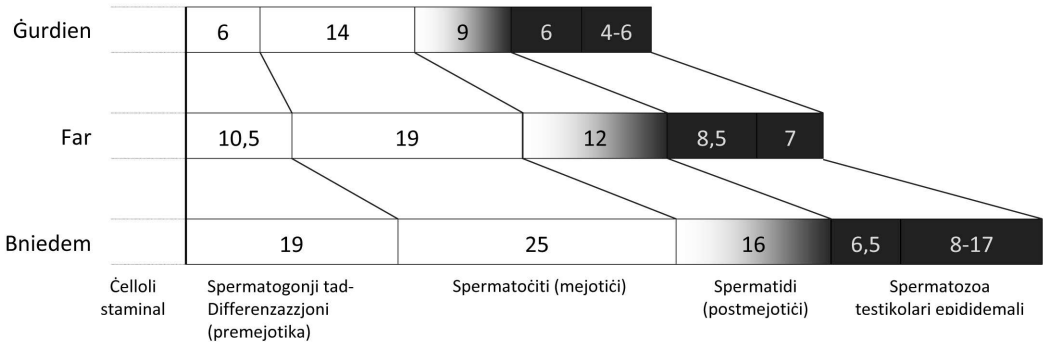


Fig.1: Tqabbil tad-durata (jiem) tal-iżvilupp taċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel fil-ġrieden, fil-firien u fil-bnedmin. It-tiswija tad-DNA ma sseħħx matul il-perjodi indikati mit-tidwil.

Skematika tal-ispermatoġenesi fil-ġrieden, fil-firien u fil-bniedem hi murija hawn fuq (meħuda minn Adler, 1996). L-ispermatogonji mhux differenzjati jinkludu: A-singla; A-pari; u spermatogonji A-allinjati (Hess u de Franca, 2008). A-singla titqies bħala ċ-ċelloli staminali veri; għalhekk, biex jiġu vvalutati l-effetti fuq iċ-ċelloli staminali jridu jgħaddu tal-anqas 49 jum (fil-ġrieden) bejn l-aħħar injezzjoni tas-sustanza kimika tat-test u t-tgħammir.

Referenzi

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Fi: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences u Springer Science&Business Media:1-15."

(4) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.23 hu ssostitwit b'dan li ġej:

"B.23 **TEST TAL-ABERRAZZJONI FIL-KROMOŻOMI SPERMATOGONI TAL-MAMMIFERI**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 483 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu u tal-kunsiderazzjonijiet relatati mat-trattament xieraq tal-annimali. Din il-verżjoni modifikata tal-metodu ta' ttestjar tirrifletti ħafna snin ta' esperjenza b'dan l-assaġġ u l-potenzjal għall-integrazzjoni jew għall-kombinament ta' dan it-test ma' studji oħra dwar it-tossiċità jew il-ġenotossiċità. Il-kombinament tal-istudji tat-tossiċità għandu l-potenzjal li jnaqqas in-numri ta' annimali użati fl-ittestjar tat-tossiċità. Dan il-metodu ta' ttestjar hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppa dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (1).

2. L-għan tat-test *in vivo* tal-aberazzjoni fil-kromożomai spermatogoni tal-mammiferi hu li jidentifika dawk is-sustanzi kimiċi li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fiċ-ċelloli spermatogoni tal-mammiferi (2) (3) (4). Barra minn hekk, dan it-test hu rilevanti għall-valutazzjoni tal-ġenotossiċità għaliex, għalkemm ivarjaw bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetika u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-rispons. Dan il-metodu ta' ttestjar mhuwiex imfassal biex ikejjel l-anormalitajiet numeriċi; l-assaġġ ma jintużax bħala rutina għal dan l-għan.

3. Dan it-test ikejjel l-aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali (kemm tat-tip kromożomiku u kromatidiku) fid-diviżjoni taċ-ċelloli ġerminali spermatogoni u, għalhekk, hu mistenni jkun ibassar mutazzjonijiet li jintirtu f'dawn iċ-ċelloli ġerminali.

4. Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

5. F'dan it-test spiss jintużaw rodituri, iżda f'ċerti każijiet jista' jkun hemm speċijiet oħrajn li jkunu xierqa, jekk ikunu xjentifikament ġustifikati. Il-preparati ċitoġenetiċi standard tat-testikoli tar-rodituri jiġġeneraw metafażijiet mitotiċi (spermatogonji) u mejotiċi (spermatoċiti). Il-metafażijiet mitotiċi u mejotiċi huma identifikati fuq il-bażi tal-morfoloġija tal-kromożomi (4). Dan it-test ċitoġenetiku *in vivo* jindividwa aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-mitożijiet spermatogoni. Ċelloli oħra mmirati mhumiex l-oġġett ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

6. Biex jiġu individwati aberrazzjonijiet tat-tip kromatidiku f'ċelloli spermatogoni, l-ewwel diviżjoni taċ-ċelloli mitotiċi wara t-trattament għandha tiġi eżaminata qabel ma dawn l-aberrazzjonijiet jiġu konvertiti f'aberrazzjonijiet tat-tip kromożomatiku f'diviżjonijiet sussegwenti taċ-ċelloli. Informazzjoni addizzjonali mill-ispermatoċiti trattati tista' tinkiseb b'analiżi tal-kromożomi mejotiċi għal aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-metafażi I u fil-metafażi II tad-dijakineżi.

7. Numru ta' ġenerazzjonijiet ta' spermatogonji huma preżenti fit-testikoli (5), u dawn it-tipi differenti ta' ċelloli ġerminali jista' jkollhom spettru ta' sensittività għat-trattament bis-sustanza kimika. B'hekk, l-aberrazzjonijiet individwati jirrappreżentaw rispons aggregat ta' popolazzjonijiet ta' ċelloli spermatogoni trattati. Il-maġġoranza taċ-ċelloli mitotiċi fil-preparati tat-testikoli huma spermatogonji B, li għandhom ċiklu taċ-ċelloli ta' madwar 26 siegħa (3).

8. Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, ma jkunux se jilħqu t-testikoli, ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

9. Ġeneralment, l-annimali jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test b'rotta ta' esponiment xierqa u jiġu ewtanizzati fi żminijiet xierqa wara t-trattament. Qabel l-ewtanażja, l-annimali jiġu ttrattati b'inibitur tal-metafaži (eż. kolkiċina jew Colcemid®). Imbagħad isiru preparati ta' kromożomi miċ-ċelloli ġerminali u jiġu mtebbgħin, u ċ-ċelloli metafażiċi jiġu analizzati għal aberrazzjonijiet kromożomiċi.

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

10. Il-kompetenza f'dan l-assaġġ għandha tiġi stabbilita billi tintwera l-ħila li jiġu riprodotti r-riżultati mistennija għall-frekwenzi ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fl-ispermatogonji b'sustanzi tal-kontroll pożittiv (inklużi risponsi dgħajfa) bħal dawk elenkati fit-Tabella 1 u jinkisbu frekwenzi tal-kontroll negattiv li jkunu konsistenti mal-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll fid-dokumentazzjoni ippubblikata (eż. (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) jew mad-distribuzzjoni storika tal-kontroll tal-laboratorju, jekk disponibbli.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

11. Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali adulti żgħar b'saħħithom. Spiss jintużaw ġrieden irġiel; madankollu, l-irġiel ta' speċijiet ta' mammiferi xierqa oħra jistgħu jintużaw meta dan ikun xjentifikament ġustifikat u biex dan it-test ikun jista' jsir flimkien ma' metodu ta' ttestjar ieħor. Fir-rapport għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika meta jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex rodituri.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u tal-għalf tal-annimali

12. Għar-rodituri, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C (±3 °C). Għalkemm idealment l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun tal-anqas ta' 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Ir-rodituri għandhom jinżammu fi gruppi żgħar (mhux aktar minn ħamsa f'kull gaġġa) jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva, idealment f'gaġeġ solidi (ta' mal-art) b'arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat.

Preparazzjoni tal-annimali

13. Normalment jintużaw annimali irġiel adulti żgħar f'saħħithom (8-12-il ġimgħa fil-bidu tal-kura) u dawn jiġu assenjati b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u tal-kura. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu uman u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikroċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fil-widnejn jew fis-swaba') u jitħallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-anqas ħamest ijiem. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u mis-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni bejn il-piżijiet tal-annimali individwali għandha tkun minima u ma taqbiżx ± l-20 %.

Preparazzjoni tad-doża

14. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi jew f'veikoli xierqa jew jitħalltu f'dieta jew f'ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponimenti bit-teħid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

Kundizzjonijiet tat-test - Solvent/veikolu

15. Is-solvent/veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli tad-doża użati, u ma għandux ikun kapaċi li joħloq reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħra li ma jkunux magħrufa sew, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' *data ta'* riferiment li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Hu rrakkomandat li, kull fejn ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz likwidu. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu l-ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetil, żejt taż-żebbuġa u żejt tal-qamħirrum. Fin-nuqqas ta' *data* storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huma indotti ebda aberrazzjoni kromożomika strutturali u effett dannuż ieħor minn solvent/veikolu atipiku magħżul, għandu jsir studju inizjali biex tiġi stabbilita l-aċċettabbiltà tal-kontroll bis-solvent/bil-veikolu.

Kontrolli pożittivi

16. Dejjem għandhom jintużaw annimali tal-kontroll pożittiv konkorrenti sakemm il-laboratorju ma jkunx wera proficjenza fit-twettiq tat-test u jkun uża t-test bħala rutina fl-imgħoddi riċenti (eż. matul l-aħħar 5 snin). Meta ma jkunx hemm grupp tal-kontroll pożittiv konkorrenti inkluż, il-kontrolli tal-punteġġ (lametti fissi u mhux imlewnin) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Dawn jistgħu jinkisbu billi fl-ikklassifikar tal-istudju jiddaħħlu kampjuni ta' riferiment xierqa li nkisbu u nħażnu minn esperiment tal-kontroll pożittiv separat imwettaq b'mod perjodiku (eż. kull 6-18-il xahar) fil-laboratorju fejn isir it-test; pereżempju, matul l-ittestjar tal-proficjenza u fuq bażi regolari wara, fejn ikun hemm bżonn.

17. Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom jipproduċu b'mod affidabbli żieda identifikabbli fil-frekwenzi taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fuq il-livelli spontanji. Id-dożi tal-kontroll pożittiv għandhom jingħażlu biex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tal-kampjuni kodifikati lil min jaqrahom. Fit-Tabella 1 hemm inklużi eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv.

Tabella 1

Eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv

Sustanzi [Nru CAS] (nru ta' riferiment)
Ċiklofosfamid (monoidrat) [Nru CAS 50-18-0 (Nru CAS 6055-19-2)] (9)
Ċikloessilamina [Nru CAS 108-91-8]
Mitomiċina C [Nru CAS 50-07-7] (6)
Akrilammid monomeriku [CAS 79-06-1] (10)
Trietilenmelamina [CAS 51-18-3] (8)

Kontrolli negattivi

18. L-annimali tal-kontrolli negattivi, trattati b'solvent jew b'veikolu waħdu, u mill-bqija trattati bl-istess mod bħall-gruppi tal-kura, għandhom ikunu inklużi għal kull ħin tal-kampjunar. Fin-nuqqas ta' *data* tal-kontroll storika jew ippubblikata li turi li ma kien indott ebda aberrazzjoni kromożomika jew effett ta' tħassir ieħor mis-solvent/mill-veikolu magħżul, l-annimali tal-kontroll mhux trattati għandhom ikunu inklużi wkoll għal kull ħin tal-kampjunar biex tiġi stabbilita aċċettabbiltà tal-kontroll tal-veikolu.

PROĊEDURA

Numru ta' annimali

19. Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju għandhom jiġu stabbiliti bl-għan li tal-anqas jiġu pprovduti ħames annimali rġiel għal kull grupp. Dan in-numru ta' annimali għal kull grupp jitqies li hu biżżejjed biex tiġi pprovduta saħħa statistika adegwata (jiġifieri ġeneralment ikun jista' jiġi individwat tal-anqas irdoppjar fil-frekwenza tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi meta l-livell tal-kontroll negattiv ikun 1,0 % jew akbar bi probabbiltà ta' 80 % f'livell ta' sinifikat ta' 0,05) (3) (11). Bħala gwida għar-rekwiżiti tipiċi massimi tal-annimali, studju f'żewġ waqtiet tal-kampjunar bi tliet gruppi tad-doża u grupp tal-kontroll negattiv konkorrenti, flimkien ma' grupp tal-kontroll pożittiv (kull wieħed imsawwar minn ħames annimali għal kull grupp), ikun jeħtieġ 45 annimal.

Skeda tat-trattament

20. Normalment is-sustanzi kimiċi tat-test jingħataw darba (jiġifieri bħala trattament wieħed); jistgħu jintużaw reġimi tad-doża oħra, dment li ma jkunux xjentifikament ġustifikati.

21. Fil-grupp tal-ogħla doża jittieħdu żewġ kampjuni wara t-trattament. Ladarba l-ħin meħtieġ għall-bidu u l-metaboliżmu tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test kif ukoll l-effetti tagħha fuq il-kinetika taċ-ċikli taċ-ċelloli jistgħu jaffettwaw il-ħin ottimali għall-individwar tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi, jintużaw ħin tal-kampjunar wieħed bikri u ħin ieħor tard madwar 24 u 48 siegħa wara t-trattament. Għal dożi li mhumiex l-ogħla doża, għandu jittieħed ħin tal-kampjunar bikri ta' 24 siegħa (anqas jew daqs il-ħin taċ-ċiklu taċ-ċelloli ta' spermatogonji B u b'hekk tiġi ottimizzata l-probabbiltà ta' għoti ta' punteġġ għall-ewwel metafażijiet ta' wara t-trattament) wara t-trattament, sakemm ma jkunx magħruf li hemm ħin ieħor tal-kampjunar aktar xieraq u ġustifikat.

22. Jistgħu jintużaw ħinijiet oħra tal-kampjunar. Pereżempju, fil-każ ta' sustanzi kimiċi li jeħilsu effetti indipendenti mis-S, ħinijiet tal-kampjunar aktar bikrin (jiġifieri anqas minn 24 siegħa) jistgħu jkunu xierqa.

23. Jista' jintuża reġim ta' trattament ta' doża ripetuta, bħal flimkien ma' test fuq punt ta' tmiem ieħor li juża perjodu ta' amministrazzjoni ta' 28 jum (eż., TM B.58); madankollu, gruppi ta' annimali addizzjonali jkunu meħtieġa jakkomodaw ħinijiet tal-kampjunar differenti. Għalhekk, l-idoneità ta' skeda bħal din trid tiġi aġġustata xjentifikament skont kull każ individwali.

24. Qabel l-ewtanażja, l-annimali jiġu injettati intraperitonalment b'doża xierqa ta' sustanza kimika li twaqqaf l-metafaži (eż. Colcemid® jew kolkiċina). Wara dan, jittieħed kampjun mill-annimali f'intervalli xierqa. Għall-ġrieden u għall-firien, dan l-intervall hu ta' madwar 3 - 5 sigħat.

Livelli tad-doża

25. Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda *data* xierqa diġà disponibbli biex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jridu jintużaw fl-istudju ewlieni, skont ir-rakkomandazzjonijiet għat-twettiq ta' studji ta' individwazzjoni tad-doża (26). Dan l-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala d-doża li tinduċi effetti tossiċi ħfief b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, imġiba jew reazzjonijiet anormali, dipressjoni minuri tal-piż tal-ġisem jew ċitotossiċità tas-sistema ematopoetika) iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigħ, ta' tbatija jew ta' diffikultà li jeħtieġu ewtanażja tal-annimali (27).

26. L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fiċ-ċelloli spermatogoni (eż. tnaqqis fil-proporzjon bejn mitożijiet spermatogoni sal-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi). Dan it-tnaqqis ma għandux jaqbeż il-50 %).

27. Is-sustanzi kimiċi tat-test b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi mhux tossiċi baxxi (bħal ormoni u mitoġeni), u sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni ta' proprjetajiet tossikokinetiċi jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' tfassil tad-dożi u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

28. Biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju sħiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv (paragrafu 18) u tal-anqas tliet livelli ta' doża ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda b'mhux akbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċix tossiċità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-*data* eżistenti, l-ogħla doża għal amministrazzjoni waħda għandha tkun ta' 2 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tossiċità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom idealment ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew ebda tossiċità. Meta tiġi osservata tossiċità tat-tessut fil-mira (jiġifieri testikoli) fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, hu rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'dożi mhux tossiċi. Studji li jkollhom l-għan li jikkaratterizzaw iktar bis-sħiħ l-informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża jistgħu jeħtieġu gruppi tad-doża addizzjonali. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn rekwiżiti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw. Jekk is-sustanza kimika tat-test tipproduċi tossiċità, għandhom jintgħażlu d-doża limitu flimkien ma' żewġ dożi inferjuri (kif deskritti aktar 'il fuq). Id-doża limitu għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew aktar hi ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, u għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' anqas minn 14-il jum id-doża limitu hi ta' 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum.

Amministrazzjoni tad-doża

29. Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħażlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-teħid man-nifs, jew b'impjant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħażel biex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut fil-mira. L-injezzjoni intraperitoneali normalment ma tkunx rakkomandata sakemm ma tkunx xjentifikament ġustifikata peress li normalment ma tkunx rotta fiżjoloġikament rilevanti ta' esponiment tal-bniedem. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew fl-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wieħed, wieħed għandu joqgħod attent li l-ħin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u l-kampjunar ikun biżżejjed biex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (ara l-paragrafi 33). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew b'injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun ta' aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża massimu ta' 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi akbar minn dan (jekk ikunu permessi mil-leġiżlazzjoni dwar it-trattament xieraq tal-annimali) għandu jkun iġġustifikat. Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

Osservazzjonijiet

30. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrin jidhru l-aktar l-effetti antiċipati. Tal-inqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju, tal-anqas darba fil-ġimgħa matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-fażi tal-ewtanażja. Fi studji twal tal-anqas ġimgħa, il-kejlijiet tal-konsum tal-ikel għandhom isiru tal-anqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-anqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanizzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (13).

Preparazzjoni tal-kromożomi

31. Eżatt wara l-ewtanażja, is-sospensjonijiet taċ-ċelloli ġerminali jinkisbu minn testikola waħda, jew mit-tnejn, esposti għal soluzzjoni ipotonika u ffissati skont il-protokolli stabbiliti (eż. (2) (14) (15). Imbagħad iċ-ċelloli jitferrxu fuq il-lametti u jitlewnu (16) (17). Il-lametti kollha għandhom ikunu kodifikati biex l-identità tagħhom ma tkunx disponibbli għal min jiggradahom.

Analiżi

32. Tal-anqas 200 metafażi mifruxa sew għandhom jiġu ggradati għal kull annimal (3) (11). Jekk il-frekwenza tal-kontroll negattiv storiku tkun < 1 %, aktar minn 200 ċellola/annimal għandhom jiġu gradati biex tiżdied is-saħħa statistika (3). Għandhom jintużaw metodi ta' tilwin li jippermettu l-identifikazzjoni taċ-ċentromeru.

33. Aberrazzjonijiet tat-tip kromożomiku u kromatidiku għandhom jiġu reġistrati għalihom u jiġu klassifikati skont is-sottotipi (ksur, skambji). Id-diskrepanzi għandhom jiġu reġistrati, iżda mhux kunsidrati, meta jiġi determinat jekk sustanza kimika tinduċix żidiet sinifikanti fl-inċidenza ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi. Il-proċeduri użati fil-laboratorji għandhom jiżguraw li l-analiżi tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi ssir minn persuni mħarrġa kif suppost fl-għoti ta' punteġġ. Fid-dawl tal-fatt li l-proċeduri ta' preparazzjoni tal-lametti spiss jirriżultaw fil-ksur ta' sehem mill-metafażijiet li jirriżulta fit-telf ta' kromożomi, iċ-ċelloli li jingħataw punteġġ għandu jkun fihom għadd ta' ċentromeri ta' mhux inqas minn $2n \pm 2$, fejn n hi n-numru aplojdi ta' kromożomi għal dik l-ispeċi.

34. Għalkemm l-iskop tat-test hu li jindividwa aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali, importanti li jiġu reġistrati l-frekwenzi ta' ċelloli poliplojdi u ta' ċelloli bi kromożomi endoreduplikati meta jiġu osservati dawn l-avvenimenti (ara l-Paragrafu 44).

DATA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

35. *Data* dwar l-annimali individwali għandha tiġi ppreżentata f'forma ta' tabelli. Għal kull annimal għandhom jiġu evalwati n-numru ta' ċelloli b'aberrazzjoni(jiet) kromożomika/ċi strutturali u n-numru ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi għal kull ċellola. L-aberrazzjonijiet tat-tip kromatidiku u kromożomiku klassifikat skont is-sottotipi (ksur, skambji) għandhom jiġu elenkati b'mod separat bin-numri u bil-frekwenzi tagħhom għall-gruppi sperimentali u tal-kontroll. Id-diskrepanzi jiġu reġistrati b'mod separat. Il-frekwenza tad-diskrepanzi tiġi rapportata iżda, ġeneralment, ma tkunx inkluża fl-analiżi tal-frekwenza totali ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali. Il-perċentwal ta' poliplojdija u ta' ċelloli bi kromożomi endoreduplikati jiġi rapportat meta jiġi osservat.

36. Għandha tiġi rrapportata d-*data* dwar it-tossiċità u s-sinjali kliniċi (skont il-Paragrafu 30).

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

37. Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabbiltà ta' test.

— Il-kontroll negattiv konkorrenti hu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll negattiv, li ġeneralment ikunu mistennija jkunu > 0 % u ≤ 1,5 % taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi, u u mad-*data* storika tal-kontroll tal-laboratorju jekk tkun disponibbli (ara l-Paragrafi 10 u 18).

— Il-kontrolli pożittivi konkorrenti jinduċu risponsi li jkunu konsistenti man-normi ppubblikati għad-*data* storika tal-kontroll pożittiv, jew mal-bażi tad-*data* storika tal-kontroll pożittiv tal-laboratorju, jekk disponibbli, u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-Paragrafi 17, 18).

— Ġew analizzati numri adegwati ta' ċelloli u ta' dożi (ara l-Paragrafi 28 u 32).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-Paragrafi 25 u 26.

38. Jekk jiġu osservati mitożi u mejożi, il-proporzjon ta' mitożijiet spermatogoni għall-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi għandu jkun determinat bħala kejl taċ-ċitotossiċità għall-annimali trattati u tal-kontroll negattiv kollha f'kampjun totali ta' 100 ċellola diviżorja għal kull annimal. Jekk tiġi osservata mitożi biss, l-indiċi mitotiku għandu jiġi determinat f'tal-anqas 1 000 ċellola għal kull annimal.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

39. Tal-inqas tliet gruppi tad-doża kkurati għandhom jiġu analizzati biex tiġi pprovduta biżżejjed *data* għal analiżi tar-rispons għad-doża.

40. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva biċ-ċar jekk:

— tal-anqas waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;

— iż-żieda hi relatata mad-doża tal-anqas f'ħin tal-kampjunar wieħed; u,

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mill-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson) jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi fiċ-ċelloli spermatogoni tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mid-dokumentazzjoni (11) (18). It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal bħala l-unità sperimentali.

41. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva biċ-ċar jekk:

— l-ebda waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti;

— ma jkun hemm ebda żieda relatata mad-doża f'xi kundizzjoni sperimentali; u,

— ir-riżultati kollha jaqgħu fi ħdan il-medda aċċettabbli tad-*data* tal-kontroll negattiv, jew tad-*data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson), jekk disponibbli.

Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titqies li mhix kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli spermatogoni tal-annimali tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mid-dokumentazzjoni (11) (18). Riżultat negattiv ma jeskludix il-possibbiltà li s-sustanza kimika tista' tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'fażijiet tal-iżvilupp aktar tard mhux studjati, jew mutazzjonijiet tal-ġeni.

42. Ma hemm ħtieġa għal verifika ta' rispons pożittiv jew negattiv ċar.

43. Jekk ir-rispons ma jkunx negattiv jew pożittiv b'mod ċar, u bħala għajnuna għall-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda dgħajfa jew ambigwa), id-*data* għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri li jużaw id-*data* sperimentali eżistenti, bħal kunsiderazzjoni ta' jekk ir-riżultat pożittiv jaqax barra mill-medda aċċettabbli ta' *data* tal-kontroll negattiv, jew ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (19).

44. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u għaldaqstant jiġi konkluż bħala ekwivoku.

45. Żieda fin-numru ta' ċelloli poliplojdi tista' tindika li s-sustanza kimika tat-test għandha l-potenzjal li tinibixxi l-proċessi mitotiċi u tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi numeriċi (20). Żieda fin-numru ta' ċelloli bi kromożomi endoreduplikati tista' tindika li s-sustanza kimika tat-test għandha l-potenzjal li tinibixi progress fiċ-ċiklu taċ-ċelloli (21) (22), li hu mekkaniżmu differenti ta' induzzjoni ta' tibdiliet kromożomiċi numeriċi mill-inibizzjoni tal-proċessi mitotiċi (ara l-Paragrafu 2). Għaldaqstant, l-inċidenza ta' ċelloli poliplojdi u ċelloli bi kromożomi endoreduplikati għandha tiġi reġistrata b'mod separat.

Rapport tat-test

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

Sommarju.

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-mezz.

— il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-teħid man-nifs;

— id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż. l-istabbiltà, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

L-annimali tat-test:

— l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla;

— l-għadd u l-età tal-annimali,

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-metodu għall-identifikazzjoni unika tal-annimali

— għal studji fuq terminu qasir: il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— *data* tal-kontrolli pożittivi u negattivi (veikolu/solvent);

— *data* minn studju għat-tiftix tal-medda, jekk ikun sar;

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— raġuni prinċipali għall-ħinijiet tas-sagrifiċċju;

— metodi għall-kejl tat-tossiċità tal-annimali, inklużi, fejn disponibbli, l-analiżijiet istopatoloġiċi jew ematoloġiċi u l-frekwenza li biha saru l-osservazzjonijiet u ttieħdu l-piżijiet tal-ġisem tal-annimali;

— il-metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laħqet it-tessut fil-mira, jew iċ-ċirkolazzjoni ġenerali, jekk jinkisbu riżultati negattivi;

— id-doża proprja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet;

— il-metodu tal-ewtanażja;

— il-metodu tal-analġeżija (meta tintuża)

— il-proċeduri għall-iżolament tat-tessuti;

— l-identità tas-sustanza kimika li twaqqaf il-metafaża, il-konċentrazzjoni tagħha u d-durata tat-trattament;

— il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti;

— il-kriterji għall-ikklassifikar tal-aberrazzjonijiet;

— in-numru ta' ċelloli analizzati għal kull annimal;

— kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Ir-riżultati:

— il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;

— il-piżijiet tal-ġisem u tal-organi matul is-sagrifiċċju (jekk jintużaw diversi trattamenti, il-piżijiet tal-ġisem meħuda matul ir-reġim tat-trattament);

— sinjali ta' tossiċità;

— indiċi mitotiku;

— il-proporzjon ta' ċelloli tal-mitożi spermatogoni għall-ewwel u t-tieni metafażijiet mejotiċi, jew evidenza oħra ta' esponiment għat-tessut fil-mira;

— it-tip u n-numru ta' aberrazzjonijiet, mogħtija separatament għal kull annimal;

— in-numru totali ta' aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;

— in-numru ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard;

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;

— l-analiżijiet statistiċi u l-metodi applikati;

— *data* konkorrenti tal-kontroll negattiv;

— *data* storika tal-kontroll negattiv b'meded, b'medji, b'devjazzjonijiet standard, u b'intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (fejn disponibbli), jew *data* storika ppubblikata tal-kontroll negattiv użata għall-aċċettabbiltà tar-riżultati tat-test;

— *data* konkorrenti tal-kontroll pożittiv;

— tibdiliet fil-plojdija, inklużi l-frekwenzi ta' ċelloli poliplojdi u/jew endoreduplikati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariġi

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Fi: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt u J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. u Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. u de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Fi: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Fi: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. u Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., u Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., u Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. u Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. u Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(14) Yamamoto, K. u Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. u Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., u Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. u Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, Fi: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Report. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.u Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays fi: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. u Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. u Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. u Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Anewplojdija: kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Ċentromeru: Reġjun(i) ta' kromożomu li miegħu huma assoċjati fibri rqaq waqt id-diviżjoni taċ-ċellola, li jippermettu l-moviment b'ċertu ordni ta' kromożomi sekondarji għall-poli ta' ċelloli sekondarji.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

Diversità tal-kromożomi: diversità tal-forom tal-kromożomi (eż. metaċentriċi, akroċentriċi, eċċ) u d-daqsijiet.

Aberrazzjoni tat-tip kromatidiku: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-ġdid bejn kromatidi.

Aberrazzjoni tat-tip kromożomiku: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-ġdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

Klastoġenu: kwalunkwe sustanza kimika li tikkawża aberrazzjonijiet kromożomiċi f'popolazzjonijiet ta' ċelloli jew ta' organiżmi.

Vojt: leżjoni akromatika iżgħar mill-wisa' ta' kromatid wieħed, u b'misallinjament minimu tal-kromatidi.

Ġenotossiċi: terminu ġenerali li jkopri t-tipi kollha ħsara lid-DNA jew lill-kromożomi, inklużi ksur, tħassiriet, addotti, modifiki u konnessjonijiet tan-nukleotidi, riarranġamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew ħsara fil-kromożomi stabbli.

Indiċi mitotiku (MI): il-proporzjon ta' ċelloli fil-metafażi diviż bin-numru totali ta' ċelloli osservati f'popolazzjoni ta' ċelloli; indikazzjoni tal-livell ta' profilerazzjoni ta' dik il-popolazzjoni.

Mitożi: diviżjoni tan-nukleu taċ-ċelloli li normalment jinqasam fi profażi, prometafażi, metafażi, anafażi u telofażi.

Mutaġeniku: jipproduċi tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Anormalità numerika: tibdil fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristiku normali tal-annimali użati.

Poliplojdija: multiplu tan-numru aplojdu ta' kromożomi (*n*) minbarra n-numru diplojdu (jiġifieri 3*n*, 4*n* u l-bqija).

Aberrazzjoni strutturali: tibdil fl-istruttura tal-kromożomi li wieħed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku tal-istadju metafażiku tad-diviżjoni taċ-ċelloli, osservati bħala tħassir u biċċiet, skambji.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti u Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa"

(5) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.40 hu sostitwit b'dan li ġej:

"*B.40* **KORRUŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IL-METODU TA' TTESTJAR TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANJA (TER))**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 430 tal-OECD (2015). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrożi viżibbli permezz tal-epidermis u fid-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1])]. Dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat B.40 jipprovdi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU (1) u s-CLP.

2. Il-valutazzjoni tal-korrużività tal-ġilda tipikament involviet l-użu ta' annimali tal-laboratorju (TM B.4, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD oriġinarjament adottata fl-1981, u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) (2). Minbarra t-TM B.40 preżenti, metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra għall-ittestjar tal-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi ġew validati u adottati bħala TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) (3) u TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) (4), li wkoll huma kapaċi jidentifikaw subkategoriji ta' sustanzi kimiċi korrużivi meta jkun hemm bżonn. Ġew adottati diversi metodi ta' ttestjar *in vitro* validati bħala TM B.46 (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD (5), biex jintużaw għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda. Dokument ta' gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom diversi sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (6).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmiem tas-saħħa umana. Hu bbażat fuq il-metodu ta' ttestjar tar-reżistenza elettrika transkutanja (TER) tal-ġilda tal-firien, li juża diski tal-ġilda biex jidentifika l-korrużivi mill-ħila tagħhom li jipproduċu telf ta' integrità ormali *stratum corneum* u funzjoni barriera. Il-linja gwida tat-test korrispondenti tal-OECD oriġinarjament ġiet adottata fl-2004 u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA.

4. Biex jiġi evalwat l-ittestjar tal-korrużjoni tal-ġilda *in vitro* għall-finijiet regolatorji, saru studji ta' qabel il-validazzjoni (7) segwiti minn studju tal-validazzjoni formali tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda (8) (9) (10) (11). L-eżitu ta' dawn l-istudji wassal għar-rakkomandazzjoni li l-metodu ta' ttestjar TER (imsejjaħ il-Metodu ta' Referenza Validat – VRM) jista' jintuża għall-finijiet regolatorji għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda *in vivo* (12) (13) (14).

5. Qabel ma metodu ta' ttestjar TER *in vitro* simili jew modifikat propost għall-korrużjoni tal-ġilda li mhuwiex il-VRM ikun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex tiġi żgurata s-similarità tiegħu għall-VRM, skont ir-rekwiżiti tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) (15). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu ta' ttestjar propost ġdid jew aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluż fil-linja gwida tat-test korrispondenti tal-OECD.

DEFINIZZJONIJIET

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

7. Studju tal-validazzjoni (10) u studji ppubblikati oħra (16) (17) irrapportaw li l-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien kapaċi jiddiskrimina bejn korrużivi tal-ġilda magħrufa u mhux korrużivi b'sensittività ġenerali ta' 94 % (51/54) u bi speċifiċità ta' 71 % (48/68) għal bażi ta' *data* ta' 122 sustanza.

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda *in vitro*. Jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP. Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar, kif murija mill-istudji ta' validazzjoni (8) (9) (10) (11), hi li dan ma jippermettix is-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi u ta' taħlitiet korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP. Il-qafas regolatorju applikabbli jiddetermina kif se jintuża dan il-metodu ta' ttestjar. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-saħħa (5). Għal evalwazzjoni sħiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermali wieħed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-IATA (6).

9. Firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw primarjament sustanzi ġiet ittestjata fil-validazzjoni li hi l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar u l-bażi ta' *data* empirika tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 60 sustanza kimika li tkopri firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi (8) (9). Fuq il-bażi tad-*data* ġenerali disponibbli, dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi u ta' stati fiżiċi li jinkludu likwidi, semisolidi, solidi u xama'. Madankollu, peress li għal ma hemmx disponibbli għalkollox oġġetti tat-test b'*data* ta' riferiment xierqa għal stati fiżiċi speċifiċi, ta' min jinnota li matul il-validazzjoni ġie vvalutat numru komparabbilment żgħir ta' xama' u ta' solidi korrużivi. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' sustanzi, il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' sustanzi. Barra minn hekk, dan il-metodu ta' ttestjar hu prežunt bħala applikabbli għal taħlitiet bħala estensjoni tal-applikabbiltà tiegħu għas-sustanzi. Madankollu, minħabba l-fatt li t-taħlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-taħlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' taħlitiet (*eż.* skont strateġika kif proposta minn Eskes *et al.*, 2012) (18), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' taħlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju maħsub, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx ivvalutati fi studji ta' validazzjoni (8) (9). Filwaqt li hu konċepibbli li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi jintuża l-metodu ta' ttestjar TER, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata għal mhux aktar minn 24 siegħa fuq l-uċuħ epidermiċi ta' diski ta' ġilda f sistema tat-test b'żewġ kompartimenti fejn id-diski tal-ġilda jaħdmu bħala s-separazzjoni bejn il-kompartimenti. Id-diski tal-ġilda jittieħdu minn firien maqtula b'mod uman ta' età ta' 28-30 jum. Is-sustanzi kimiċi korriżivi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jipproduċu telf ta' integrita normali ta' *stratum corneum* u tal-funzjoni ta' barrjera, li jitkejjel bħala tnaqqis fit-TER 'l isfel minn livell ta' limitu (16) (ara l-paragrafu 32). Għat-TER tal-ġilda tal-firien, intgħażel valur ta' limitu ta' 5kΩ ibbażat fuq *data* estensiva għal varjetà kbira ta' sustanzi fejn il-maġġoranza l-kbira ta' valuri kienu jew sew aktar 'il fuq (spiss > 10 kΩ), jew sew aktar 'l isfel (spiss < 3 kΩ) minn dan il-valur (16). B'mod ġenerali, is-sustanzi kimiċi tat-test li mhumiex korrużivi fl-annimali iżda li huma irritanti jew mhux irritanti ma jnaqqsux it-TER inqas minn dan il-valur ta' limitu. Barra minn hekk, l-użu ta' preparati ta' ġilda oħrajn jew tagħmir ieħor jista' jibdel il-valur ta' limitu, li jeħtieġ aktar validazzjoni.

11. Hu inkorporat fil-proċedura tat-test pass li jorbot iż-żebgħa sabiex isir it-test ta' konferma tar-riżultati pożittivi fit-TER inklużi valuri madwar 5 kΩ. Il-pass li jorbot iż-żebgħa jiddetermina jekk iż-żjieda fil permeabbiltà ionika hijiex minħabba qerda fiżika tal-*istratum corneum*. Il-metodu TER tal-ġilda tal-firien wera li jista' jbassar il-korrużività *in vivo* fil-fenek ivvalutat taħt it-TM B.4 (2).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

12. Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tnax-il Sustanza ta' Profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mill-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (16)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1.

Tabella 1

Lista ta' Sustanzi ta' Proficjenza ([1])

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika ([3])	GHS tan-NU/CLP Kat. Ibbażata fuq Riżultati *In Vivo* ([3])	VRM Kat. Ibbażata fuq Riżultati *In Vitro*	Stat Fiżiku	pH ([4])
Korrużivi *In Vivo*						
N,N'-Dimetil dipropilentriammina	10563-29-8	bażi organika	1A	6 × C	L	8,3
1,2-Diamminopropan	78-90-0	bażi organika	1A	6 × C	L	8,3
Aċidu sulfuriku (10 %)	7664-93-9	aċidu inorganiku	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
Idrossidu tal-potassju (10 % soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	bażi inorganika	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
Aċidu ottanojku (Kapriliku)	124-07-2	aċidu organiku	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-terz-Butilfenol	88-18-6	fenol	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Non korrużivi *in vivo*						
Aċidu isosteariku	2724-58-5	aċidu organiku	NC	6 × NC	L	3,6
4-Ammino-1,2,4-triażol	584-13-4	bażi organika	NC	6 × NC	S	5,5
Fenetil bromur	103-63-9	elettrofil	NC	6 × NC	L	3,6
4-(Metiltjo)-benżaldeid	3446-89-7	elettrofil	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-Dekadjen	1647-16-1	organiku newtrali	NC	6 × NC	L	3,9
Tetrakloroetilen	127-18-4	organiku newtrali	NC	6 × NC	L	4,5

Abbrevjazzjonijiet: aq = soluzzjoni milwiema; CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; VRM = Metodu ta' Referenza Validat; C = korrużiva; NC = mhux korrużiva.

([1]) Is-sustanzi ta' proficjenza, imqassma l-ewwel skont il-korrużivi kontra dawk mhux korriżivi, imbagħad skont is-subkategorija tal-korrużivi u mbagħad skont il-klassi kimika, intgħażlu mis-sustanzi użati fl-istudju ta' validazzjoni tal-ECVAM tal-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien (8) (9). Sakemm ma jkunx indikat mod ieħor, is-sustanzi ġew ittestjati fil-livell ta' purità miksub meta nxtraw minn sors kummerċjali (8). L-għażla, sa fejn possibbli, inkludiet sustanzi li: (i) huma rappreżentattivi tal-firxa ta' risponsi tal-korrużività (eż. nonkorrużivi; korrużivi dgħajfa sa b'saħħithom) li l-VRM kapaċi jkejjel jew ibassar; (ii) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudju ta' validazzjoni; (iii) jirriflettu l-karatteristiċi tal-prestazzjoni tal-VRM; (iv) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew; (v) jinduċu riżultati definittivi fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment *in vivo*; (vi) huma kummerċjalment disponibbli; u (vii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.

([3]) Il-klassi kimika assenjata minn Barratt *et al.* (8).

([3]) Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għall-kategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

([4]) Il-valuri tal-pH inkisbu minn Fentem *et al.* (9) u minn Barratt *et al.* (8).

PROĊEDURA

13. Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOP) għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda TER tal-ġilda tal-firien huma disponibbli (19). Il-metodu ta' ttestjar TER tal-ġilda tal-firien koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jikkonformaw mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

Annimali

14. Il-firien għandhom jintużaw għaliex is-sensittività tal-ġilda tagħhom għal sustanzi f'dan il-metodu ta' ttestjar intweriet fl-imgħoddi (12) u huma l-uniku sors ta' ġilda li ġie validat b'mod formali (8) (9). L-età (meta tinġabar il-ġilda) u l-ispeċi tal-far huma partikolarment importanti biex jiġi żgurat li l-follikoli tax-xahar fil-fażi dormanti qabel ma jibda t-tkabbir tax-xahar adult.

15. Ix-xahar dorsali u tal-ġenb minn firien żgħar, ta' età ta' madwar 22 jum (derivati minn Wistar jew fergħa komparabbli), jitneħħa bir-reqqa b'qattiegħ ix-xahar żgħir. Imbagħad l-annimali jiġu maħsula billi jintmesħu bl-attenzjoni, filwaqt li l-parti bix-xagħar maqtugħ tiġi mgħarrqa f'taħlita antibijotika (li pereżempju, li jkun fiha streptomiċina, peniċillina, kloramfenikol, u amfoteriċina, f konċentrazzjonijiet li huma effettivi biex jinibixxu t-tkabbir tal-batterji). L-annimali jerġgħu jiġu maħsula bl-anitibjotiċi fit-tielet jew ir-raba' jum wara l-ewwel ħasla u jintużaw fi żmien tlitt ijiem wara t-tieni ħasla, meta l-*istratum corneum* ikun irkupra mit-tneħħija tax-xahar.

Il-preparazzjoni tad-diski tal-ġilda

16. L-annimali jinqatlu umanament meta jagħlqu 28-30 jum; din l-età hi kritika. Il-ġilda dorso-laterali ta' kull annimal imbagħad titneħħa u jinqatgħalha x-xaħam subkutanju eċċess billi titqaxxar bil-galbu mill-ġilda. Id-diski tal-ġilda, b'djametru ta' madwar 20 mm kull wieħed, jitneħħew. Il-ġilda tista' tiġi maħżuna qabel ma jintużaw id-diski fejn jidher li d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tkun ekwivalenti għal dik miksuba b'ġilda friska.

17. Kull disk tal-ġilda jitqiegħed fuq wieħed mit-truf ta' tubu PTFE (politetrafluworoetilen), li jiżgura li l-wiċċ epidermiku hu f kuntatt mat-tubu. Ċirku "O" tal-gomma jitwaħħal billi jingħafas mat-tarf tat-tubu biex il-ġilda tinżamm f postha u t-tessut żejjed jiġi maqtugħ. Iċ-ċirku "O" tal-ġilda imbagħad jiġi ssiġġillat bir-reqqa mat-tarf tat-tubu PTFE bl-ingwent. It-tubu hu appoġġjat minn molla ġewwa parti reċettorja li fiha taħlita ta' MgSO4 (154 mM) (Figura 1). Id-disk tal-ġilda għandha tiġi għal kollhox meqruda fit-taħlita ta' $MgSO_4$. Minn ġilda ta' far wieħed jistgħu jinkisbu daqs 10 – 15-il disk tal-ġilda. Id-dimensjonijiet tat-tubu u taċ-ċirku "O" jintwerew fil-Figura 2.

18. Qabel ma jibda l-ittestjar, it-TER taż-żewġ diski tal-ġilda jitkejlu bħala proċedura ta' kontroll tal-kwalità għal kull ġilda tal-annimal. Iż-żewġ diski għandhom jagħtu valuri ta' reżistenza elettrika akbar minn 10 kΩ biex jintużaw il-bqija tad-diski għall-metodu ta' ttestjar. Jekk il-valur tar-reżistenza huwa inqas minn 10 kΩ, il-bqija tad-diski minn dik il-ġilda għandha tintrema.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

19. Għandhom jintużaw kontrolli konkorrenti pożittivi u negattivi għal kull sessjoni (esperiment) biex tiġi żgurata l-ħidma xierqa tal-mudell esperimentali. Id-diski tal-ġilda minn annimal wieħed għandhom jintużaw f'kull sessjoni (esperiment). Is-sustanzi kimiċi tat-test tal-kontroll pożittiv jew negattiv suġġeriti huma 10M aċidu idrokloriku u ilma ddistillat, rispettivament.

20. Is-sustanzi kimiċi tat-test likwidi (150 µL) huma applikati b'mod uniformi mal-wiċċ epidermiku ġewwa t-tubu. Meta jiġu ttestjati materjali solidi, hu applikat ammont biżżejjed ta' solidu b'mod livell fuq id-disk biex jiġi żgurat li l-wiċċ kollu tal-epidermis hu kopert. Jiżdied l-ilma dejoniżżat (150 µL) fuq is-solidu u t-tubu jiġi aġitat bil-mod. Biex jinkiseb il-kuntatt massimu mal-ġilda, is-solidi jistgħu jkunu jridu jissaħħnu sa 30 ° C biex tinħall jew tiġi mrattba s-sustanza kimika tat-test, jew mitħuna biex jipproduċu materjal granurali jew terra.

21. Jintużaw tliet diski tal-ġilda għal kull sustanza kimika tat-test u tal-kontroll f'kull sessjoni ta' ttestjar (esperiment). Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu applikati għal 24 siegħa f'20-23 ° C. Is-sustanza kimika tat-test titneħħa bil-ħasil b'ġett ta' ilma tal-vit f'temperatura li tasal sa dik ambjentali sakemm ma jifdal ebda materjal ieħor li jista' jitneħħa.

Il-kejl tat-TER

22. L-impedenza tal-ġilda titkejjel bħala TER bl-użu ta' Wheatstone bridge b'vultaġġ baxx u kurrent alternanti (18). L-ispeċifikazzjonijiet ġenerali tal-bridge huma vultaġġ operattiv ta' 1-3 Volt, kurrent sinus jew rettangolari alternat ta' 50 - 1 000 Hz, u firxa tal-kejl ta' mhux anqas minn 0,1 – -30 kΩ. Id-databridge użat fl-istudju tal-validazzjoni kejjel l-induttanza, il-kapaċitanza u r-reżistenza sa valuri ta' 2 000 H, 2 000 µF, u 2 MΩ, rispettivament bi frekwenzi ta' 100 Hz jew 1 kHz, bl-użu ta' valuri serje jew paralleli. Għal-għanijiet tal-korrożività tat-TER il-kejl tal-figura hu rrekordjat f reżistenza, bi frekwenzi ta' 100 Hz u bl-użu ta' valuri serje. Qabel ma titkejjel ir-reżistenza elettrika, it-tensjoni tal-wiċċ tal-ġilda titnaqqas billi jiżdied volum suffiċjenti ta' etanol 70 % biex ikopri l-epidermis. Wara ftit sekondi, l-ethanol jitneħħa mit-tubu u mbagħad t-tessut jiġi idratat billi tiżdied soluzzjoni ta' 3 ml $MgSO_4$ (154 mM). L-elettrodi tad-databridge jitqiegħdu fuq kull naħa tad-disk tal-ġilda biex titkejjel ir-reżistenza f kΩ/disk tal-ġilda (Figura 1). Id-dimensjonijiet tal-elettrodi u t-tul tal-elettrodu espost taħt il-klipep tal-kukkudrill jintwerew fil-Figura 2. Il-klipp imqabbda mal-elettrodu intern titqiegħed fuq il-wiċċ tat-tubu PTFE matul il-kejl tar-resistenza, biex ikun żgurat li jiddaħħal tul konsistenti tal-elettrodu fis-soluzzjoni ta' $MgSO_4$. L-elettrodu ta' barra jitqiegħed ġewwa l-kamra riċeventi biex isserraħ fuq il-qiegħ tal-kompartiment. Id-distanza bejn il-molla u l-qiegħ tat-tubu PTFE tinżamm kostanti (Figura 2), għaliex din id-distanza taffettwa l-valur ta' reżistenza miksub. Għalhekk, id-distanza bejn l-elettrodu ta' ġewwa u d-disk tal-ġilda għandha tkun kostanti u minimali (1-2 mm).

23. Jekk il-valur tar-reżistenza mkejjel ikun akbar minn 20 kΩ, dan jista' jkun dovut għall-fdalijiet tas-sustanza kimika tat-test li jiksu l-wiċċ epidermiku tad-disk tal-ġilda. Tista' tiġi ppruvata t-tneħħija ulterjuri ta' din il-kisja, pereżempju, billi t-tubu PTFE jiġi ssiġillat bis-saba' kbir b'ingwanta u jitħawwad għal madwar 10 sekondi; is-soluzzjoni ta' $MgSO_4$ tintrema u jerġa' jsir il-kejl tar-reżistenza b' $MgSO_4$ ġdid.

24. Il-karatteristiċi u d-dimensjonijiet tal-apparat tat-test u l-proċedura tal-esperiment użati jistgħu jinfluwenzaw il-valuri tat-TER miksuba. Il-limitu korrożiv ta' 5 kΩ ġie żviluppat mid-*data* miksuba fl-apparat u fil-proċdura speċifiċi użati f dan il-metodu ta' ttestjar. Jistgħu jgħoddu valuri differenti tal-limitu u tal-kontroll jekk jinbidlu l-kundizzjonijiet tat-test jew jintuża apparat differenti. Għalhekk, hu meħtieġ li jiġu kkalibrati l-metodoloġija u l-valuri tal-limiti tar-reżistenza bl-ittestjar ta' serje ta' Sustanzi ta' Profiċjenza magħżula mis-sustanzi fl-istudju tal-validazzjoni (8) (9), jew minn klassijiet tas-sustanzi kimiċi li jkunu simili għas-sustanzi li jkunu qed jiġu investigati. Sett ta' Sustanzi ta' Profiċjenza xierqa hu identifikat fit-Tabella 1.

Metodi ta' Fissazzjoni tal-Kulurant

25. L-esponiment ta' xi materjali mhux korrużivi jista' jirriżulta fi tnaqqis tar-reżistenza 'l isfel mil-limitu ta' 5 kΩ li jippermetti l-mogħdija ta' joni mill-*istratum corneum*, u b'hekk titnaqqas ir-reżistenza elettrika (9). Pereżempju, l-organiċi newtri u s-sustanzi li għandhom karatteristiċi tensjoattivi (inklużi deterġenti, emulsifikanti u tensjoattivi oħrajn) jistgħu jneħħu l-lipidi tal-ġilda b'tali mod li jagħmlu l-barriera aktar permeabbli għall-joni. Għalhekk, jekk il-valuri TER prodotti mit-tali sustanzi kimiċi jkunu anqas minn jew madwar 5 kΩ fin-nuqqas ta' dannu viżwalment perċettibbli tad-diski tal-ġilda, tista' ssir valutazzjoni tal-penetrazzjoni tal-kulurant fuq it-tessuti tal-kontroll u dawk trattati biex jiġi determinat jekk il-valuri tat-TER miksuba kinux ir-riżultat tal-permeabbiltà akbar tal-ġilda, jew tal-korrużjoni tal-ġilda (7) (9). Fil-każ tal-aħħar fejn jinqasam l-*istratum corneum*, il-kulurant sulforodammina B, meta applikat mas-superfiċje tal-ġilda, jippenetra malajr u jtebba' t-tessut ta' taħt. Dan il-kulurant partikolari hu stabbli għal varjetà kbira ta' sustanzi u mhuwiex affettwat mill-proċedura tal-estrazzjoni deskritta hawn taħt.

Applikazzjoni u Tneħħija tal-kulurant Sulforodammina B

26. Wara l-valutazzjoni tat-TER, is-sulfat tal-manjeżju jintrema mit-tubu u l-ġilda tiġi eżaminata bir-reqqa għal dannu ovvju. Jekk ma jkun hemm ebda dannu maġġuri ovvju (*eż.* perforazzjoni), 150 µl ta' dilwizzjoni ta' 10 % (w/v) fl-ilma distillat tal-kulurant sulforodammina B (Aħmar Aċidu 52; C.I. 45100; Numru CAS 3520-42-1), tiġi applikata għall-wiċċ epidermiku ta' kull disk tal-ġilda għal sagħtejn. Dawn id-diski tal-ġilda mbagħad jinħaslu bl-ilma tal-vit sa temperatura ambjentali għal madwar 10 sekondi biex jitneħħa l-kulurant eċċessiv/mhux użat. Kull disk tal-ġilda mbagħad jitneħħa bl-attenzjoni mit-tubu PTFE u jitqiegħed f'kunjett (*eż.* flixkun tal-ħġieġ tax-xintillazzjoni ta' 20 ml) li jkun fih ilma dejonizzat (8 ml). Il-fliexken jiġu aġitati bil-mod għal ħames minuti biex jitneħħa kulurant żejjed mhux użat. Din il-proċedura ta' tlaħliħ imbagħad tiġi ripetuta, u wara dan jitneħħew id-diski tal-ġilda u jitqiegħdu fi fliexken li fihom 5 ml ta' 30 % (w/v) dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) fl-ilma distillat u jiġu inkubati mal-lejl f'temperatura ta' 60 ° C.

27. Wara l-inkubazzjoni, kull disk tal-ġilda jitneħħa u jintrema u l-bqija tas-soluzzjoni tiġi ċċentrifugata għal tmien minuti f'temperatura ta' 21 ° C (forza relattiva ċentrifugali ~175 × g). Kampjun ta' 1 ml tas-supernatant jiġi dilwit 1 f'5 (v/v) [jiġifieri 1 ml + 4 ml] ma' 30 % (w/v) SDS fl-ilma ddistillat. Id-densità ottika (OD) tas-soluzzjoni titkejjel f'565 nm.

Il-kalkolu tal-kontenut tal-kulurant

28. Il-kontenut tal-kulurant sulforodammina B għal kull disk jiġi kkalkolat mill-valuri OD (9) (koeffiċjent ta' estinzjoni molari tal-kulurant sulforodammina B ta' 565 mm = 8,7 × 10^4; piż molekolari = 580). Il-kontenut tal-kulurant jiġi determinat għal kull disk tal-ġilda bl-użu ta' kurva xierqa tal-kalibrazzjoni u l-kontenut medju tal-kulurant imbagħad jiġi kkalkolat għar-repliki.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

29. Ir-riżultati medji tat-TER huma aċċettati jekk il-valuri tal-kontroll pożittiv u negattiv konkorrenti jaqgħu fl-iskali aċċettabbli għall-metodi fil-laboratorju tat-test. L-iskali aċċettabli tar-reżistenza għall-metodoloġija u l-apparat deskritti hawn fuq jingħataw f'din it-tabella li ġejja:

Kontroll	Sustanza	Medda ta' reżistenza (kΩ)
Pożittiv	10M Aċidu idrokloriku	0,5 - 1,0
Negattiv	Ilma distillat	10 - 25

30. Ir-riżultati medji tal-fissazzjoni tal-kulurant jiġu aċċettati b'kundizzjoni li l-valuri konkorrenti tal-kontroll jaqgħu fil-meded aċċettabbli għall-metodu. Meded aċċettabbli suġġeriti tal-kontenut tal-kulurant għas-sustanzi tal-kontroll għall-metodoloġija u għall-apparat deskritti hawn fuq jingħataw fit-tabella li ġejja:

Kontroll	Sustanza	Medda ta' kontenut tal-kulurant (μg/disk)
Pożittiv	10M Aċidu idrokloriku	40 - 100
Negattiv	Ilma distillat	15 - 35

Interpretazzjoni tar-riżultati

31. Il-valur ta' limitu TER li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test korrużivi minn dawk mhux korrużivi ġie stabbilit matul l-ottimizzazzjoni tal-metodu ta' ttestjar, ittestjat matul fażi ta' prevalidazzjoni, u kkonfermat fi studju ta' validazzjoni formali.

32. Il-mudell ta' tbassir għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda TER tal-ġilda tal-firien (9) (19), assoċjat mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, hu pprovdut hawn taħt:

Is-sustanza kimika tat-test titqies li mhix korrużiva għall-ġilda:

i) jekk il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun akbar minn (>) 5kΩ, jew

ii) il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas jew daqs (≤) 5kΩ, u

— id-diski tal-ġilda ma juru ebda dannu ovvju (*eż.* perforazzjoni), u

— il-kontenut medju ta' kulurant tad-disk jkun anqas (<) mill-kontenut medju ta' kulurant tad-disk tal-kontroll pożittiv 10M Hcl miksub b'mod konkorrenti (ara l-paragrafu 30 għall-valuri tal-kontroll pożittiv).

Is-sustanza kimika tat-test titqies li hi korrużiva għall-ġilda:

i) jekk il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas minn jew daqs (≤) 5 kΩ u d-diski tal-ġilda jkollhom dannu ovvju (eż. perforati), jew

ii) il-valur TER medju miksub għas-sustanza kimika tat-test ikun anqas jew daqs (≤) 5kΩ, u

— id-diski tal-ġilda ma juru ebda dannu ovvju (*eż.* perforazzjoni), iżda

— il-kontenut medju ta' kulurant tad-disk jkun akbar (>) mill-kontenut medju ta' kulurant tad-disk tal-kontroll pożittiv 10M Hcl miksub b'mod konkorrenti (ara l-paragrafu 30 għall-valuri tal-kontroll pożittiv).

33. Sessjoni ta' ttestjar (esperiment) magħmula minn tal-anqas tliet diski tal-ġilda rreplikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew TER medja daqs 5 ± 0,5 k, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni ta' ttestjar indipendenti (esperiment), kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet ta' ttestjar (esperimenti).

DATA U RAPPORTAR

Data

34. Il-valuri tar-reżistenza (kΩ) u l-valuri tal-kontenut tal-kulurant (µg/disk), fejn xieraq, għas-sustanza kimika tat-test, kif ukoll għall-kontrolli pożittivi u negattivi għandhom jiġu rrapportati f'forma tabulari, inkluża d-*data* għal kull disk rreplikat individwali f'kull sessjoni ta' ttestjar (esperiment) u l-valuri medji ± SD. L-esperimenti ripetuti kollha għandhom jiġu rrapportati. Id-dannu osservat fid-diski tal-ġilda għandu jiġi rrapportat għal kull sustanza kimika tat-test.

Rapport tat-test

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

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tishin, it-thin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Annimali tat-Test:

— Razza u sess użati;

— L-età tal-annimali meta użati bħala annimali donaturi;

— Is-sors, il-kundizzjoni tal-abitazzjoni, id-dieta, eċċ.;

— Id-dettalji tal-preparazzjoni tal-ġilda.

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-kurvi tal-kalibrazzjoni għall-apparat tat-test;

— Il-kurvi tal-kalibrazzjoni għat-twettiq tat-test tal-fissazzjoni tal-kulurant, il-band pass użat għall-kejl tal-valuri tal-OD, u l-medda tal-linearità tal-OD tal-apparat tal-kejl (*eż.* spettrofotometru), jekk xieraq;

— Id-dettalji tal-proċedura tat-test użata biex titkejjel it-TER;

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata għall-valutazzjoni tal-fissazzjoni tal-kulurant, jekk xieraq;

— Id-dożi tat-test użati, id-durata tal-perjodu/i tal-esponiment u t-temperatura/i tal-esponiment;

— Dettalji dwar il-proċedura tal-ħasil użata wara l-perjodu tal-esponiment;

— In-numru ta' diski tal-ġilda rreplikati użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (kontroll pożittiv u negattiv);

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

— Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:

i) Aċċettabbiltà tal-valuri TER tal-kontrolli pożittivi u negattivi (f'k) b'referenza għall-meded tar-reżistenza tal-kontrolli pożittivi u negattivi

ii) Aċċettabbiltà tal-valuri tal-kontenut tal-kulurant tal-kontrolli pożittivi u negattivi (f'µg/disk) b'referenza għall-meded tal-kontenut tal-kulurant tal-kontrolli pożittivi u negattivi

iii) Aċċetabbiltà tar-riżultati tat-test b'referenza għall-varjabbiltà storika bejn ir-repliki tad-diski tal-ġilda

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' deċiżjoni/tal-mudell ta' tbassir applikati.

Ir-riżultati:

— Tabulazzjoni tad-*data* mill-assaġġi tat-TER u tal-fissazzjoni tal-kulurant (jekk xieraq) għal sustanzi kimiċi tat-test u għal kontrolli individwali, għal kull sessjoni ta' ttestjar (esperiment) u għal kull replika tad-diski tal-ġilda (annimali individwali u kampjuni tal-ġilda individwali), medji, SDs u CVs;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe effett osservat;

— Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

(2) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Akuta tal-Ġilda.

(3) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Mudell tal-Ġilda *In Vitro*.

(4) Il-Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.

(5) Il-Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., u Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., u Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., u Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., u Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjentifika tat-Test ta' Reżistenza Elettrika Transkuntanja tal-Ġilda tal-Firien (TER) (Test *In Vitro* għall-Korrużività tal-Ġilda), Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC10), 3 ta' April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., u Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.*24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., u Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. u Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol*. 62, 393-403.

(19) TER SOP (Diċembru 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

Figura 1

Apparat Għall-Assaġġ Tat-Ter Tal-Ġilda Tal-Firien

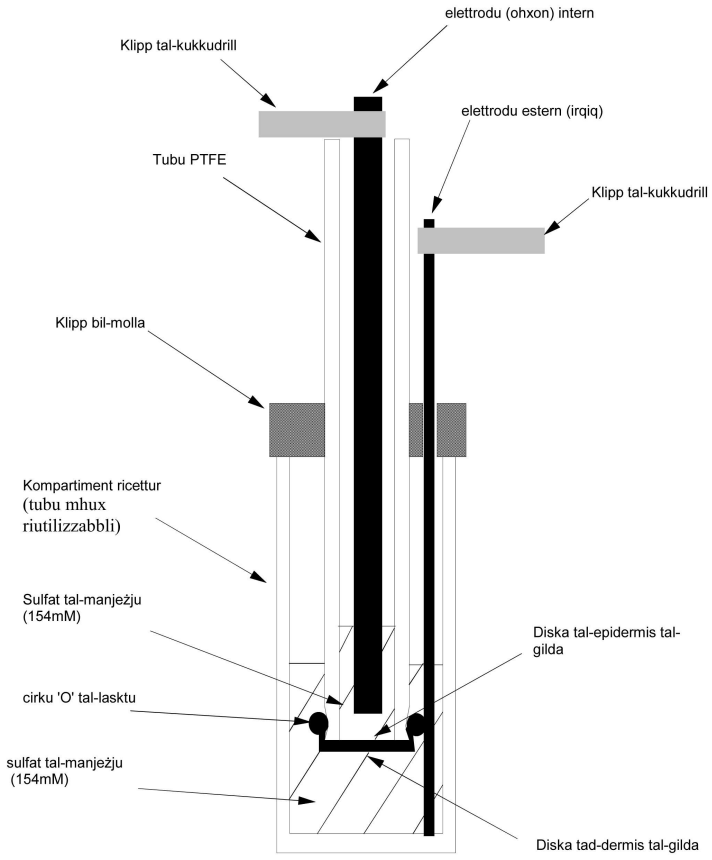
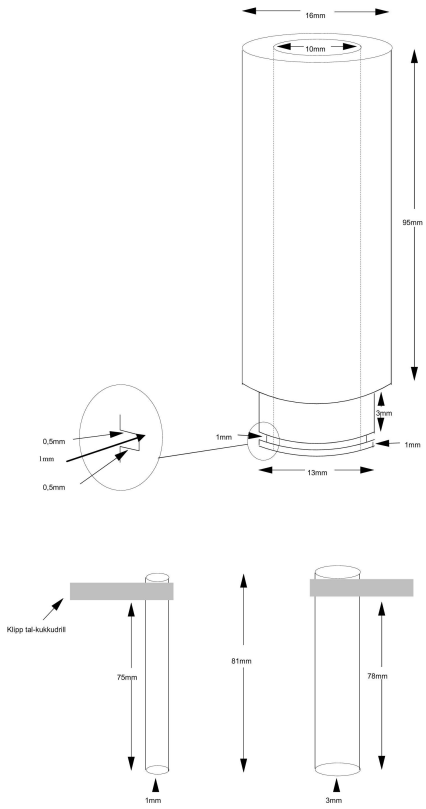


Figura 2

Dimensjonijiet Tat-Tubu Tal-Politetrafluworoetilen (Ptfe) U T-Tubi Reċettorji U L-Elettrodi Użati



Il-fatturi kritiċi tal-apparat muri fuq:

— Id-djametru ġewwieni tat-tubu tal-PTFE,

— It-tul tal-elettrodi relattivi għat-tubu tal-PTFE u t-tubu reċettorju, b'tali mod li d-disk tal-ġilda ma għandux jintmess mill-elettrodi u li tul standard tal-elettrodu hu f'kuntatt mas-soluzzjoni $MgSO_4$;

— L-ammont tas-soluzzjoni $MgSO_4$ fit-tubu reċettorju għandu jagħti fond ta' likwidu, relattiv għal-livell fit-tubu tal-PTFE, kif muri fil-Figura 1,

— Id-disk tal-ġilda għandu jitwaħħal tajjeb biżżejjed mat-tubu tal-PTFE, b'tali mod li r-reżistenza elettrika tkun kejl veru tal-karatteristiċi tal-ġilda.

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (20).

C: Korrużiv.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Konkordanza: Kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (20).

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (NU)): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

IATA: Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

NC: Mhux korrużiva.

OD: Densità Ottika.

PC: Kontroll Pożittiv, replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattat b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Standards tal-prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratezza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (20).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (20).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (20).

Korrużjoni tal-ġilda *in vivo*: Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrożi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minħabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopeċja, u ċikatriċi L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (20).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinkludi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sessjoni (ta' ttestjar): Sustanza kimika tat-test waħda testjata b'mod konkorrenti f'minimu ta' tliet diski tal-ġilda rreplikati.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER): hi kejl tal-impendenza elettrika tal-ġilda, bħala valur ta' reżistenza f'kilo Ohms. Metodu sempliċi u robust biex tiġi stmata l-funzjoni ta' barrjera bir-rekordjar tal-passaġġ tal-joni mill-ġilda bl-użu ta' apparat Wheatstone bridge.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa."

(6) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.40bis hu ssostitwit b'dan li ġej:

"B.*40bis* **KORRUŻJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: METODU TA' TTESTJAR TAL-EPIDERMIS UMAN RIKOSTITWIT (RhE)**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 431 tal-OECD (2016). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrożi viżibbli permezz tal-*epidermis* u fid-*dermis*, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1])]. Dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat B.40bis jipprovdi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Jippermetti wkoll subkategorizzazzjoni parzjali tal-korrużivi.

2. Il-valutazzjoni tal-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi tipikament kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju (TM B.4 ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD; oriġinarjament adottata fl-1981 u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015) (2). Minbarra l-metodu ta' ttestjar B.40bis preżenti, żewġ metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra għall-ittestjar tal-potenzjal ta' korrużjoni tas-sustanzi kimiċi ġew validati u adottati bħala TM B.40 (ekwivalenti għat-TG 430 tal-OECD) (3) u TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) (4). Barra minn hekk, it-TM B.46 *in vitro* (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD) (5) ġie adottat għall-ittestjar tal-potenzjal ta' irritazzjoni tal-ġilda. Dokument ta' gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża d-*data* eżistenti dwar l-ittestjar u mhux tal-ittestjar għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (6).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-korrużjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmiem tas-saħħa umana. Jagħmel użu minn *epidermis* uman rikostitwit (RhE) (miksub minn keratinoċiti epidermali mhux trasformati derivati mill-bniedem) li jimita mill-qrib il-proprjetajiet istoloġiċi, morfoloġiċi, bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-partijiet ta' fuq tal-ġilda tal-bniedem, jiġifieri l-*epidermis*. Il-linja gwida korrispondenti tal-OECD oriġinarjament ġiet adottata fl-2004 u aġġornata fl-2013 biex tinkludi metodi ta' ttestjar addizzjonali bl-użu tal-mudelli RhE u l-possibbiltà li jintużaw il-metodi għas-sostenn tas-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi korrużivi, u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tintroduċi l-użu ta' proċedura alternattiva għall-kejl tal-vijabbiltà.

4. F'dan il-metodu ta' ttestjar huma inklużi erba' mudelli RhE kummerċjalment disponibbli. Saru (11) (12) studji ta' prevalidazzjoni (7), segwiti minn studju formali ta' validazzjoni għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda (8)(9)(10) għal tnejn minn dawn il-mudelli tat-test kummerċjalment disponibbli, EpiSkin™ Standard Model (SM) u EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (imsejħa fit-test segwenti bħala l-Metodi ta' Referenza Validat - VRMs). L-eżitu ta' dawn l-istudji wassal għar-rakkomandazzjoni li ż-żewġ VRMs imsemmija hawn fuq jistgħu jintużaw għall-finijiet regolatorji ta' distinzjoni ta' sustanzi korrużivi (C) minn sustanzi mhux korrużivi (NC), u li barra minn hekk EpiSkin™ jista' jintuża biex isostni s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi korrużivi (13)(14)(15). Żewġ mudelli oħra tat-test RhE tal-korrużjoni tal-ġilda *in vitro* disponibbli kummerċjalment urew riżultati simili għall-VRM EpiDerm™ skont il-validazzjoni bbażata fuq il-PS (16)(17)(18). Dawn huma SkinEthic™ RHE ([2]) u epiCS® (qabel imsejħa EST-1000) li jistgħu jintużaw ukoll għall-finijiet regolatorji ta' distinzjoni tas-sustanzi korrużivi minn dawk mhux korrużivi (19)(20). L-istudji ta' wara l-validazzjoni mwettqa mill-produtturi tal-mudell tal-RhE fis-snin 2012 sal-2014 bi protokoll irfinut li jikkoreġi interferenzi ta' tnaqqis mhux speċifiku ta' MTT mis-sustanzi kimiċi tat-test tejbu l-prestazzjoni kemm fid-diskriminazzjoni tas-C/NC kif ukoll fis-sostenn tas-subkategorizzazzjoni tal-korrużivi (21)(22). Analiżijiet statistiċi ulterjuri tad-*data* ta' wara l-validazzjoni ġġenerata b'EpiDerm™ SCT, bi SkinEthic™ RHE u b'EpiCS® saru bl-għan li jidentifikaw mudelli ta' tbassir alternattivi li tejbu l-kapaċità ta' tbassir għas-subkategorizzazzjoni (23).

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

([2]) L-abbrevjazzjoni RhE (=Epidermis uman Rikostitwit) tintuża għall-mudelli kollha bbażati fuq teknoloġija tal-RhE. L-abbrevjazzjoni RHE kif użata flimkien mal-mudell SkinEthic™ tfisser l-istess, iżda, bħala parti mill-isem ta' dan il-metodu ta' ttestjar speċifiku kif kummerċjalizzat, hi miktuba kollha kemm hi b'ittri kapitali.

5. Qabel ma metodu ta' ttestjar tal-RhE *in vitro* simili jew modifikat propost għall-korrużjoni tal-ġilda li mhuwiex il-VRMs ikun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex tiġi żgurata s-similarità tiegħu għall-VRMs, skont ir-rekwiżiti tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) (24) stabbiliti skont il-prinċipji tad-dokument ta' gwida Nru 34 tal-OECD (25). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu ta' ttestjar propost ġdid jew aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluż fil-linja gwida tat-test korrispondenti. Il-mudelli tat-test inklużi fil-linja gwida tat-test jistgħu jintużaw biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-riżultati tat-testijiet fuq il-metodu ta' ttestjar *in vitro* għall-korrużjoni tal-ġilda, filwaqt li jibbenefikaw mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data*.

DEFINIZZJONIJIET

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

7. Dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti li jiġu identifikati sustanzi u taħlitiet mhux korrużivi u korrużivi skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Dan il-metodu ta' ttestjar ikompli jsostni s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi u ta' taħlitiet korrużivi fis-subkategorija fakultattiva 1A, skont il-GHS tan-NU (1), kif ukoll taħlita tas-subkategoriji 1B u 1C (21)(22)(23). Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar hi li ma jippermettix id-diskriminazzjoni bejn is-subkategorija 1B u s-subkategorija 1C tal-korrużivi tal-ġilda skont il-GHS tan-NU u s-CLP minħabba s-sett limitat ta' sustanzi kimiċi korrużivi *in vivo* ferm magħrufa tas-subkategorija 1C. Il-mudelli tat-test EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE u epiCS® jistgħu jiġu subkategorizzati (jiġifieri 1A kontra 1B-u-1C kontra NC)

8. Firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi li primarjament tirrappreżenta sustanzi individwali ġiet ittestjata fil-validazzjoni li ssostni l-mudelli tat-test inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar meta jintużaw għall-identifikazzjoni ta' sustanzi mhux korrużivi u korrużivi; il-bażi ta' *data* empirika tal-istudju ta' validazzjoni kien fiha 60 sustanza kimika li jkopru firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi (8)(9)(10). L-ittestjar biex jintwerew is-sensittività, l-ispeċifiċità, l-akkuratezza u ir-riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju tal-assaġġ għas-subkategorizzazzjoni sar mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar u r-riżultati ġew rieżaminati mill-OECD (21) (22) (23). Fuq il-bażi tad-*data* ġenerali disponibbli, dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal firxa wiesgħa ta' klassijiet kimiċi u ta' stati fiżiċi li jinkludu likwidi, semisolidi, solidi u xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu mitħuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda trattament preċedenti ieħor tal-kampjun. F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-mudelli tat-test inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' sustanzi kimiċi tat-test, dawn ma għandhomx jintużaw għal dik il-kategorija speċifika ta' sustanzi kimiċi tat-test. Barra minn hekk, dan il-metodu ta' ttestjar hu prežunt bħala applikabbli għal taħlitiet bħala estensjoni tal-applikabbiltà tiegħu għas-sustanzi. Madankollu, minħabba l-fatt li t-taħlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-taħlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' taħlitiet (*eż.* skont strateġika kif proposta f'(26)), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' taħlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx ivvalutati fi studji ta' validazzjoni (8)(9)(10). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

9. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejlijiet tal-vijabbiltà tat-tessut u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet. It-tip ta' kontrolli adattati li jistgħu jkunu meħtieġa se jvarja skont it-tip ta' interferenza prodotta mis-sustanza kimika tat-test u l-proċedura użata biex jitkejjel MTT formażan (ara l-paragrafi 25-31).

10. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-saħħa u hu bbażat fuq l-istess sistema tat-test tal-RhE, bl-użu ta' protokoll ieħor (5). Għal evalwazzjoni sħiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermali wieħed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (6). Dan l-approċċ tal-IATA jinkludi t-twettiq ta' testijiet *in vitro* għall-korrożjoni tal-ġilda (bħal kif deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar) u l-irritazzjoni tal-ġilda qabel ma jitqies l-ittestjar fl-annimali ħajjin. Hu rikonoxxut li l-użu ta' ġilda umana hu soġġett għal konsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, ifformata minn keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-*epidermis* uman, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermis* uman. Din tikkonsisti f'saff tal-qiegħ, f'saff spinuż u f'saff granulari organizzati, u fi *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellolari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analogu għal dawk li jinstabu *in vivo*.

12. Il-metodu ta' ttestjar tal-RhE hu bbażat fuq il-premessa li s-sustanzi kimiċi korrużivi jistgħu jinfdu l-*istratum corneum* permezz tad-diffużjoni jew tal-erożjoni, u huma ċitotossiċi għaċ-ċelloli li jinsabu fis-saffi ta' taħt. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli titkejjel b'konverżjoni enzimatika tal-kulurant vitali MTT [bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5- difeniltetrażolju, bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil; Numru CAS 298-93-1], f'melħ tal-formażan blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (27). Is-sustanzi kimiċi korrużivi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà taċ-ċelloli taħt il-livelli limitu definiti (ara l-paragrafi 35 u 36). Il-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni tal-ġilda bbażat fuq l-RhE wera li jbassar effetti tal-korrużjoni tal-ġilda *in vivo* vvalutati fil-fniek skont it-TM B.4 (2).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

13. Qabel l-użu ta' rutina ta' kwalunkwe wieħed mill-erba' metodi ta' ttestjar validati tal-RhE li jaderixxu ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tnax-il Sustanza ta' Profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. Fil-każ ta' użu ta' metodu għas-subklassifikazzjoni, għandha tintwera s-subkategorizzazzjoni korretta wkoll. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (24)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1.

Tabella 1

Lista ta' Sustanzi ta' Profiċjenza ([1])

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika ([2])	Kat. tal-GHS tan-NU/tas-CLP fuq il-bażi tar-riżultati *In Vivo* ([3])	VRM Kat. Ibbażata fuq riżultati ([4])*In Vitro*	Riduċent tal-MTT ([5])	Stat Fiżiku
Korrużivi *In Vivo* tas-Subkategorija 1A						
Aċidu bromoaċetiku	79-08-3	Aċidu organiku	1A	(3) 1A	—	S
Diidrat tat-trifluworur tal-Boron	13319-75-0	Aċidi inorganiċi	1A	(3) 1A	—	L
Fenol	108-95-2	Fenol	1A	(3) 1A	—	S
Klorur tad-Dikloroaċetil	79-36-7	Elettrofil	1A	(3) 1A	—	L
Taħlita ta' Korrużivi *In Vivo* tas-subkategoriji 1B u 1C						
Monoidrat tal-aċidu gliossiliku	563-96-2	Aċidu organiku	1B-u-1C	(3) 1B-u-1C	—	S

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika ([2])	Kat. tal-GHS tan-NU/tas-CLP fuq il-bażi tar-riżultati *In Vivo* ([3])	VRM Kat. Ibbażata fuq riżultati ([4])*In Vitro*	Riduċent tal-MTT ([5])	Stat Fiżiku
Korrużivi *In Vivo* tas-Subkategorija 1A						
Aċidu lattiku	598-82-3	Aċidu organiku	1B-u-1C	(3) 1B-u-1C	—	L
Etanolammina	141-43-5	Bażi organika	1B)	(3) 1B-u-1C	Y	Viskuż
Aċidu idrokloriku (14,4 %)	7647-01-0	Aċidi inorganiċi	1B-u-1C	(3) 1B-u-1C	—	L
Mhux korrużivi *In Vivo*						
Bromur tal-fenetil	103-63-9	Elettrofil	NC	(3) NC	Y	L
4-Amino-1,2,4-triażol	584-13-4	Bażi organika	NC	(3) NC	—	S
4-(metiltjo)-benżaldeid	3446-89-7	Elettrofil	NC	(3) NC	Y	L
Aċidu lawriku	143-07-7	Aċidu organiku	NC	(3) NC	—	S

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; VRM = Metodu ta' Referenza Validat; NC = mhux korrużiva; I = iva; S = solidu; L= likwidu

([1]) Is-sustanzi ta' profiċjenza, imqassma l-ewwel bil-korrużivi kontra l-mhux korrużivi, u mbagħad skont is-subkategorija ta' korrużivi u mbagħad skont il-klassi kimika, intgħażlu mis-sustanzi użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-ECVAM ta' EpiSkin™ u ta' EpiDerm™ (8) (9) (10) u mill-istudji ta' wara l-validazzjoni fuq il-bażi ta' *data* pprovduta mill-iżviluppaturi ta' EpiSkin™ (22), ta' EpiDerm™, ta' SkinEthic™ u ta' epiCS®(23). Sakemm ma jkunx indikat mod ieħor, is-sustanzi ġew ittestjati fil-livell ta' purità miksub meta nxtraw minn sors kummerċjali (8) (10). L-għażla, sa fejn possibbli, tinkludi sustanzi li: (i) huma rappreżentattivi tal-firxa ta' risponsi tal-korrużività (eż. non korrużivi; korrużivi dgħajfa sa b'saħħithom) li l-VRMs kapaċi jkejlu jew ibassru; (ii) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudji ta' validazzjoni; (iii) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew; (iv) jinduċu riżultati riproduċibbli fil-VRM; (v) jinduċu riżultati definittivi fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment *in vivo*; (vi) huma kummerċjalment disponibbli; u (vii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.

([2]) Il-klassi kimika assenjata minn Barratt *et al.* (8).

([3]) Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għall-kategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

([4]) It-tbassiriet *in vitro* tal-VRM rapprotati f'din it-tabella nkisbu bil-mudelli tat-test (VRMs) ta' EpiSkin™ u ta' EpiDerm™ matul l-ittestjar ta' wara l-validazzjoni mwettaq mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar.

([5]) Il-valuri tal-vijabbiltà miksuba fl-Istudji ta' Validazzjoni tal-Korrużjoni tal-ġilda tal-ECVAM ma ġewx ikkoreġuti għat-tnaqqis dirett tal-MTT (il-kontrolli maqtula ma sarux fl-istudji tal-validazzjoni). Madankollu, id-*data* ta' wara l-validazzjoni ġenerata mill-iżviluppaturi tal-metodu ta' ttestjar li hi ppreżentata f'din it-tabella nkisbet b'kontrolli adattati (23).

14. Bħala parti mill-eżerċizzju tal-profiċjenza, hu rrakkomandat li l-utent jivverifika l-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-manifattur tal-mudell tal-RhE. Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu ta' ttestjar ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun intweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu ta' ttestjar b'rutina, hu rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

PROĊEDURA

15. Din li ġejja hi deskrizzjoni ġenerika tal-komponenti u tal-proċeduri tal-mudelli tat-test tal-RhE għall-valutazzjoni tal-korrużjoni tal-ġilda koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar. Il-mudelli tal-RhE approvati bħala xjentifikament validi għall-użu fi ħdan dan il-metodu ta' ttestjar, jiġifieri l-mudelli EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE u epiCS® (16)(17)(19)(28)(29)(30)(31)(32)(33), jistgħu jinkisbu minn sorsi kummerċjali. Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOPs) għal dawn l-erba' mudelli tal-RhE huma disponibbli (34)(35)(36)(37), u l-komponenti ewlenin tal-metodu ta' ttestjar tagħhom huma miġbura fil-qosor fl-Appendiċi 2. Hu rakkomandat li l-SOP rilevanti tiġi kkonsultata matul l-implimentazzjoni u l-użu ta' wieħed minn dawn il-mudelli fil-laboratorju. L-ittestjar bl-erba' mudelli tat-test tal-RhE b'dan il-metodu ta' ttestjar għandu jikkonforma mal-kundizzjonijiet li ġejjin:

KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHE

Kundizzjonijiet Ġenerali

16. Keratinoċiti umani mhux trasformati għandhom jintużaw biex jerġgħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegħ, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taħt *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali biex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi, pereżempju d-dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika referenzjarja tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment meħtieġ sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50 % (ET_{50}) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika referenzjarja b'konċentrazzjoni speċifika u fissa (ara l-paragrafu 18). Il-karatteristiċi ta' trażżin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-*istratum corneum* għattessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun ħieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

Kundizzjonijiet Funzjonali

Vijabbiltà

17. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà tat-tessut hu l-assaġġ MTT (27). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhE jnaqqsu l-MTT tal-kulurant vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). L-OD tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri OD < 0,1. L-MTT formażan estratt jista' jiġi kwantifikat bl-użu ta' kejl tal-assorbanza standard (OD) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (38). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom jiżguraw li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Meded tal-aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-erba' mudelli tat-test tal-RhE validati inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar huma mogħtija fit-Tabella 2. Utent tal-Ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv huma stabbli fil-koltura (jipprovdu kejl tal-OD simili) sakemm idum il-perjodu ta' esponiment.

Tabella 2

Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-kontroll tal-kwalità tal-lott

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Funzjoni ta' protezzjoni

18. L-*istratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed biex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida ta' ċerti sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi (*eż.* SDS jew Triton X-100), kif stmat minn IC_{50} jew ET_{50} (Tabella 3). Il-funzjoni ta' protezzjoni ta' kull lott tal-mudell tal-RhE użat għandha tintwera mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-mudell tal-RhE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 21).

Morfoloġija

19. L-eżaminazzjoni istoloġika tal-mudell tal-RhE għandha ssir billi tintwera struttura qisha *epidermis* uman b'diversi saffi li jkun fiha *stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum* u *stratum corneum* u turi profil lipidu simili għall-profil lipidu tal-epidermis uman. Eżaminazzjoni istoloġika ta' kull lott tal-mudell tal-RhE użat li turi morfoloġija xierqa tat-tessuti għandha tiġi pprovduta mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-mudell tal-RhE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 21).

Riproduċibbiltà

20. L-utenti tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà tal-metodi ta' ttestjar maż-żmien bil-kontrolli pożittivi u negattivi. Barra minn hekk, il-metodu ta' ttestjar għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur tal-mudell tal-RhE jipprovdi *data* li turi r-riproduċibbiltà maż-żmien b'sustanzi kimiċi korrużivi u mhux korrużivi, pereżempju, mil-lista tas-Sustanzi ta' Profiċjenza (Tabella 1). Fil-każ ta' użu ta' metodu ta' ttestjar għas-subkategorizzazzjoni, ir-riproduċibbiltà fir-rigward tas-subkategorizzazzjoni għandha tintwera wkoll.

Kontroll tal-kwalità (QC)

21. Il-mudell tal-RhE għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-*vijabbiltà* (paragrafu 17), il-*funzjoni ta' protezzjoni* (paragrafu 18) u l-*morfoloġija* (paragrafu 19) huma l-aktar rilevanti. Din id-*data* tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar, biex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Huma biss dawk ir-riżultati prodotti b'lottijiet ta' tessuti aċċettati bi QC li jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli tal-klassifikazzjoni korrużiva. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-IC50 jew għall-ET50 tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Il-meded tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tat-test validati jingħataw fit-Tabella 3.

Tabella 3

Kriterji tal-QC għar-rilaxx tal-lottijiet

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiSkin™ (SM) (trattament ta' 18 -il siegħa b' SDS) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 sigħat	ET50 = 8,7 sigħat
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 sigħat	ET50 = 10,0 sigħat
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 sigħat	ET50 = 7,0 sigħat

Applikazzjoni tas-Sustanza Kimika tat-Test u tas-Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

22. Tal-anqas għandhom jintużaw żewġ repliki tat-tessuti għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli għal kull ħin tal-esponiment. Għas-sustanzi kimiċi likwidi kif ukoll għas-sustanzi kimiċi solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test sabiex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-epidermis filwaqt li tiġi evitata doża infinita, jiġifieri għandu jintuża minimu ta' 70 µl/cm^2 jew 30 mg/cm^2. Skont il-mudelli, il-wiċċ tal-epidermis għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi solidi, biex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u l-wiċċ tal-epidermis (34)(35)(36)(37). Kull meta dan ikun

possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. Il-metodu ta' applikazzjoni għandu jkun xieraq għas-sustanza kimika tat-test (ara pereżempju r-referenzi (34-37). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinħasel bir-reqqa mill-*epidermis* b'bafer milwiem, jew b'0,9 % NaCl. Skont liema jintuża mill-erba' mudelli tat-test validati tal-RhE, jintużaw żewġ jew tliet perjodi ta' esponiment għal kull sustanza kimika tat-test (għall-erba' mudelli validi kollha tal-RhE: tliet minuti u siegħa; għal EpiSkin™ esponiment addizzjonali ta' erba' sigħat). Skont il-mudell tat-test tal-RhE użat u l-perjodu ta' esponiment ivvalutat, it-temperatura ta' inkubazzjoni matul l-esponiment tista' tvarja bejn it-temperatura ambjentali u 37 °C.

23. F'kull sessjoni għandhom jintużaw kontrolli negattivi (NC) u pożittivi (PC) konkorrenti biex jintwera li l-vijabbiltà (bil-kontrolli negattivi), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessuti li tirriżulta (bil-PC) jinsabu fi ħdan medda ta' aċċettazzjoni storika definita. Is-sustanzi kimiċi tal-PC suġġeriti huma aċidu aċetetiku glaċjali jew 8N KOH skont il-mudell tal-RhE użat. Ta' min jinnota li 8N KOH hu riduċent dirett tal-MTT li jista' jeħtieġ kontrolli adattati kif deskritti fil-paragrafi 25 u 26. Il-kontrolli negattivi suġġeriti huma 0,9 % (w/v) NaCl jew ilma.

Kejlijiet tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

24. L-analiżi tal-MTT, li hi assaġġ kwantitattiv, għandha tintuża biex titkejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli skont dan il-metodu ta' ttestjar (27). Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni tal-MTT b'konċentrazzjoni xierqa (0,3 jew 1 mg/ml) għal 3 sigħat. Imbagħad il-prodott preċipitat formażan blu jiġi estratt mit-tessuti permezz ta' solvent (e.g., isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażan titkejjel billi tiġi determinata l-OD f'570 nm permezz ta' filter band pass sa massimu ta' ±30 nm, jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafi 30 u 31)(38).

25. Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT, jew bi tnaqqis dirett tal-MTT fi blu formażan, u/jew b'interferenza tal-kulur jekk is-sustanza kimika tat-test tassorbi, b'mod naturali jew minħabba l-proċeduri ta' trattament, fl-istess medda tal-OD ta' formażan (570 ± 30 nm, primarjament sustanzi kimiċi blu u vjola). Għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex tiġi individwata u kkoreġuta interferenza potenzjali minn dawn is-sustanzi kimiċi tat-test bħall-kontroll tat-tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) u l-kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC) (ara l-paragrafi 26 sa 30). Dan hu partikolarment importanti meta sustanza kimika speċifika tat-test ma titneħħiex għalkollox mit-tessut bit-tlaħliħ jew meta din tippenetra l-*epidermis*, u għalhekk tkun preżenti fit-tessuti meta jitwettaq it-test tal-vijabbiltà tal-MTT. Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs għall-mudelli tat-test (34)(35)(36)(37).

26. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tiżdied ma' medium tal-MTT preparata ġdida (34) (35) (36) (37). Jekk it-taħlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod dirett l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq l-epidermis mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali tħaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu s-sustanza kimika tat-test f'ammont simili bħal tessuti vijabbli. Kull sustanza kimika li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula għal kull ħin tal-esponiment, li jsirilhom it-test tal-korrużjoni tal-ġilda shiħ. Imbagħad, il-vijabbiltà tat-tessuti veru tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għar-riduċent tal-MTT nieqes it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess riduċent tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSMTT).

27. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti jew mis-sustanzi kimiċi tat-test li jitlewnu meta jidħlu f'kuntatt mal-ilma jew mal-isopropanol u tittieħed deċiżjoni dwar il-ħtieġa ta' kontrolli addizzjonali, għandha ssir analiżi spettrali tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma (ambjent matul l-esponiment) u/jew fl-isopropanol (soluzzjoni tal-estrazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi d-dawl fil-medda ta' 570 ± 30 nm, għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-kolorant jew inkella għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 30 u 31). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test imlewna li tinterferixxi tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli għal kull ħin ta' esponiment, lijsirilhom

it-test sħiħ tal-korrużjoni tal-ġilda iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC_{living}). Il-kontroll tal-NSC_{living} irid jitwettaq fl-istess ħin għal kull ħin tal-esponiment għal kull sustanza kimika tat-test ikkulurita (f'kull sessjoni) minħabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT nieqes il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC_{living}).

28. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 26) u interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 27) se jkunu jeħtieġu t-tielet sett ta' kontrolli wkoll, minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC_{living} deskritti fil-paragrafi ta' qabel, meta jitwettaq il-kejl tal-assorbanza standard (OD). Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti skuri li jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT (eż. blu, vjola, suwed) minħabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 26. Dawn is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jitgħaqqdu kemm ma' tessuti ħajjin kif ukoll ma' dawk maqtula u, għalhekk, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test, iżda anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC_{living} diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSCkilled). F'dan il-kontroll addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula għal kull ħin tal-esponiment, li ssirilhom il-proċedura tal-ittestjar sħiħa iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC_{killed} wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa, iżda għandu jsir fl-istess ħin mal-kontroll tal-NSMTT u, fejn possibbli, bl-istess lott ta' tessuti. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT nieqes il-%NSC_{living} flimkien mal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC_{killed}).

29. Ta' min jinnota li t-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku u l-interferenzi tal-kulur mhux speċifiku jistgħu jżidu l-kejl tal-estratt tat-tessut f'livell ogħla mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-baġi, kull laboratorju għandu jiddetermina l-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru tiegħu bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7) minn sors kummerċjali qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji. B'mod partikolari, il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu tal-ispettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur meta l-ODs tal-estratti tat-tessuti miksuba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal tnaqqis dirett tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi ħdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru jew meta l-vijabbiltà perċentwali mhux ikkoreġuta miksuba bis-sustanza kimika tat-test diġà tkun iddefinietha bħala korrużiva (ara l-paragrafi 35 u 36). Minkejja dan, ir-riżultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew %NSC_{liVing} > 50 % tal-kontroll negattiv għandhom jittieħdu bil-galbu.

30. Għal sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti li ma jkunux kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) minħabba interferenza qawwija wisq mal-assaġġ MTT, tista' titħaddem il-proċedura alternattiva tal-ispettrofotometrija HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafu 31) (37). Is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika tat-test qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (38). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC_{liVing} jew tal-NSC_{killed} qatt ma jkunu meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta waħda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas b'mod dirett l-MTT jew ikollha kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità ta' tnaqqis dirett tal-MTT (kif deskritt fil-paragrafu 26). Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT,il-

vijabbiltà
tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT li jistgħu jkunu interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal Ods (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-ogħla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma jistgħux jiġu vvalutati, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħħu f'sitwazzjonijiet rari ħafna biss.

31. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża wkoll bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażan MTT (38). Minħabba d-diversità tas-sistemi tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' dawk deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bijoanaliticiċi (38)(39). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 4. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 4, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażan MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

32. Għal kull metodu ta' ttestjar li juża mudelli validi tal-RhE, it-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandhom jesibixxu OD li tirrifletti l-kwalità tat-tessuti kif deskritta fit-tabella 2 u ma għandhomx ikunu anqas mil-limiti storikament stabbiliti. Tessuti trattati bil-PC, jiġifieri aċidu aċetiku glaċjali jew 8N KOH, għandhom jirriflettu l-ħila tat-tessuti li jirrispondu għal sustanza kimika korrużiva fil-kundizzjonijiet tal-mudell tat-test (ara l-Appendiċi 2). Il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti tas-sustanza kimika tat-test u/jew tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll għandha taqa' fi ħdan il-limiti aċċettati għal kull rekwiżit validu tal-mudell tal-RhE (ara l-Appendiċi 2) (*eż.* id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %). Jekk il-kontroll negattiv jew il-PC inkluż f'sessjoni jaqa' barra mill-meded aċċettati, is-sessjoni titqies li mhix kwalifikata u għandha tiġi ripetuta. Jekk il-varjabbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test taqa' barra mill-medda definita, l-ittestjar tagħha għandu jerġa' jsir.

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u tat-Tbassir

33. Il-valuri tal-OD miksuba għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jintużaw biex jiġi kkalkolat il-perċentwal tal-vijabbiltà relattiva għall-kontroll negattiv, li hi stabbilita għal 100 %. F'każ li tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Il-valuri perċentwali ta' limitu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli li jiddistingwu sustanza kimika tat-test korrużiva minn waħda mhux korrużiva (jew li jiddiskriminaw bejn subkategoriji korrużivi differenti) huma definiti hawn taħt fil-paragrafi 35 u 36 għal kull wieħed mill-mudelli tat-testijiet koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar u għandhom jintużaw għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

34. Sessjoni waħda ta' ttestjar magħmula minn tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni li tirriżulta tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti, tista' tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

35. Il-mudell ta' tbassir għall-metodu ta' ttestjar tal-korrużjoni EpiSkin™ (9)(34)(22), assoċjat mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, hu muri fit-Tabella 4:

Tabella 4

Mudell ta' tbassir EpiSkin™

Il-vijabbiltà mkejla wara l-punti tal-ħin tal-esponiment (t=3, 60 u 240 minuta)	It-tbassir li għandu jiġi kkunsidrat
< 35 % wara esponiment ta' 3 min	**Korrużivi:** •Subkategorija fakultattiva 1A (*)
≥ 35 % wara esponiment ta' 3 min **U** < 35 % wara esponiment ta' 60 min **JEW** ≥ 35 % wara esponiment ta' 60 min **U** < 35 % wara esponiment ta' 240 min	**Korrużivi:** •Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B-u-1C
≥ 35 % wara esponiment ta' 240 min	**Mhux korrużivi**

(*) Skont id-*data* ġġenerata fid-dawl tal-valutazzjoni tal-utilità tal-mudelli ta' ttestjar tal-RhE għas-sostenn tas-subkategorizzazzjoni, intwera li madwar 22 % tar-riżultati tas-subkategorija 1A tal-mudell tat-test EpiSkin™ jistgħu fil-fatt jikkostitwixxu sustanzi/taħlitiet tas-subkategorija 1B jew tas-subkategorija 1C (jiġifieri sovraklassifikazzjonijiet) (ara l-Appendiċi 3).

36. Il-mudelli ta' tbassir għall-mudelli ta' ttestjar għall-korrużjoni tal-ġilda EpiDerm™ SCT (10)(23)(35), SkinEthic™ RHE (17)(18) (23) (36), u epiCS® (16)(23)(37) assoċjati mas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP, huma murija fit-Tabella 5:

Tabella 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE u epiCS®

Il-vijabbiltà mkejla wara l-punti tal-ħin tal-esponiment (t=360 minuta)	It-tbassir li għandu jiġi kkunsidrat
STADJU 1 għal EpiDerm™ SCT, għal SkinEthic™ RHE u għal epiCS®	
< 50 % wara esponiment ta' 3 min	Korrużiv
≥ 50 % wara esponiment ta' 3 min **U** < 15 % wara esponiment ta' 60 min	Korrużiv
≥ 50 % wara esponiment ta' 3 min **U** ≥ 15 % wara esponiment ta' 60 min	Mhux korrużivi
STADJU 2 għal EpiDerm™ SCT - għal sustanzi/taħlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1	
< 25 % wara esponiment ta' 3 min	Subkategorija fakultattiva 1A *

Il-vijabbiltà mkejla wara l-punti tal-ħin tal-esponiment (t=360 minuta)	It-tbassir li għandu jiġi kkunsidrat
STADJU 1 għal EpiDerm™ SCT, għal SkinEthic™ RHE u għal epiCS®	
≥ 25 % wara esponiment ta' 3 min	Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C
STADJU 2 għal SkinEthic™ RHE - għal sustanzi/taħlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1	
< 18 % wara esponiment ta' 3 min	Subkategorija fakultattiva 1A *
≥ 18 % wara esponiment ta' 3 min	Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C
STADJU 2 għal epiCS® - għal sustanzi/taħlitiet identifikati bħala Korrużivi fl-istadju 1	
< 15 % wara esponiment ta' 3 min	Subkategorija fakultattiva 1A *
≥ 15 % wara esponiment ta' 3 min	Taħlita tas-subkategoriji fakultattivi 1B u 1C

DATA U RAPPORTAR

Data

37. Għal kull test, id-*data* minn repliki tat-tessuti individwali (*eż.* valuri tal-OD u *data* dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-*data* minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rapportati l-medji u l-meded tal-vijabbiltà u s-CVs bejn ir-repliki tat-tessuti għal kull test. Interazzjonijiet osservati bir-reaġent MTT b'riduċenti diretti tal-MTT jew b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti għandhom jiġu rapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

Rapport tat-test

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

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u kwalunkwe proprjetà fiżikokimika rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tisħin, it-tħin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Il-mudell u l-protokoll tal-RhE użati u l-ħsieb warajhom (jekk applikabbli)

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-mudell tal-RhE użat (inkluż in-numru tal-lott);

— Informazzjoni dwar il-kalibrazzjoni għall-apparat tal-kejl (*eż.* spettrofotometru), it-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl;

— Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT;

— Deskrizzjoni tal-kwantifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, jekk applikabbli;

— Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:

i) Il-vijabbiltà;

ii) Il-funzjoni ta' protezzjoni;

iii) Il-morfoloġija;

iv) Ir-riproduċibbiltà u l-kapaċità ta' tbassir;

v) Il-kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell;

— Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma tkunx limitata għall-aċċettabbiltà tad-data tal-QC b'referenza għad-data tal-lottijiet storiċi;

— Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza.

Proċedura tat-Test:

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata (inklużi l-proċeduri ta' ħasil użati wara l-perjodu ta' esponiment);

— Dożi tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll użati;

— Id-durata tal-perjodu/i tal-esponiment u t-temperatura/i tal-esponiment;

— Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur, jekk applikabbli;

— In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (PC, kontroll negattiv, u NSMTT, NSCliving u NSCkilled, jekk applikabbli), għal kull ħin tal-esponiment;

— Deskrizzjoni tal-kriterji tad-deċiżjonijiet/tal-mudell tat-tbassir applikati fuq il-bażi tal-mudell tal-RhE użat;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test (inklużi l-proċeduri tal-ħasil).

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test:

— Il-valuri medji tal-kontrolli pożittivi u negattivi u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika;

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test.

Ir-riżultati:

— Tabultazzjoni tad-*data* għal sustanzi kimiċi tat-test u għal kontrolli individwali, għal kull perjodu ta' esponiment, kull sessjoni u kull kejl tar-repliki inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti, id-differenzi bejn ir-repliki, l-SDs u/jew is-CVs jekk applikabbli;

— Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, id-differenzi bejn ir-repliki tat-tessuti, l-SDs u/jew is-CVs (jekk applikabbli), u l-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessuti;

— Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bis-sustanzi kimiċi tal-kontroll b'rabta mas-sessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

— Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) NU (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, NU New York u Ġinevra. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermali Akuta.

(3) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*.

(4) Il-Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.

(5) Il-Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit.

(6) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., u Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., u Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., u Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. u Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. u Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Trijangolu Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (1998). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjenetifika tat-Test EpiSkin™ (Test *In Vitro* għall-Korrużività tal-Ġilda), Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC10), 3 ta' April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Mudell tal-Ġilda Umana EpiDerm™ għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC14), 21 ta' Marzu 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. u Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., u Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. u Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Mudell tal-Ġilda Umana SkinEthic™ għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC25), 17 ta' Novembru 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). Dikjarazzjoni tal-ESAC dwar il-Validità Xjentifika ta' Metodu ta' Ttestjar *In-Vitro* għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda: l-EST-1000, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC30), 12 ta' Ġunju 2009.

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., u Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., u Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. Fi: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M u Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. u Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J u Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. u Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS u Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF u Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (Diċembru 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (Frar 2012). Verżjoni MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

(36) SkinEthic™ RHE SOP (Jannar 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (Jannar 2012). Verżjoni 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., u McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (Mejju 2001). Disponibbli fuq: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (25).

Vijabbiltà taċ-ċelloli: Il-parametru li jkejjel l-attività sħiħa tal-popolazzjoni ċellulari *eż.* il-kapaċità tad-deidroġenaži mitokondrijali ċellulari biex titnaqqas is-sustanza koloranti vitali MTT ([bromur tat-3-(4,5-Dimetiltijażol l-2-il)-2,5-difeniltetrażolju, blu Tijażolil;), li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, jikkorrispondi għall-għadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Konkordanza: Dan hu kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (25).

ET_{50}: Jista' jiġi stmat bid-determinazzjoni tal-ħin tal-esponiment meħtieġ biex il-vijabbiltà taċ-ċelloli titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika ta' riferiment f'konċentrazzjoni speċifikata fissa, ara wkoll IC_{50}.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

HPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja.

IATA: Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

IC_{50}: Tista' tiġi stmata bid-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, ara wkoll ET_{50}.

Doża infinita: Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-*epidermis* lil hinn mill-ammont meħtieġ biex tinkesa b'mod sħiħ u uniformi s-superfiċje tal-*epidermis*. **Taħlita:** Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar li fiha ma jirreaġixxux.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

MTT: Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni > 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

NC: Mhux korrużiva.

Kontroll tal-NSC_{killed}: Kontroll tal-Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

Kontroll tal-NSC_{living}: Kontroll tal-Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti ħajjin.

NSMTT: Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

OD: Densità Ottika

PC: Kontroll Pożittiv, Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza kimika li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Standards tal-prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratezza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (25).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (25).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (25).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' PC.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (25).

Korrużjoni tal-ġilda in vivo: Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrożi viżibbli mill-*epidermis* u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minħabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopeċja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (25).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha. **Sustanza kimika tat-test:** Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Ħafna.

UVCB: sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Appendiċi 2

KOMPONENTI EWLENIN TAL-MUDELLI TAT-TEST TAL-RHE VALIDATI GĦALL-ITTESTJAR TAL-KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

Komponenti tal-Mudell tat-Test	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Superfiċje tal-mudell	0,38 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Numru ta' repliki tat-tessuti	Tal-anqas 2 għal kull ħin tal-esponiment	Tal-anqas 2-3 għal kull ħin tal-esponiment	Tal-anqas 2 għal kull ħin tal-esponiment	Tal-anqas 2 għal kull ħin tal-esponiment
Dożi u applikazzjoni tat-trattament	Likwidi u viskuży: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Solidi: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl soluzzjoni NaCl (9 g/l) Tax-xama'/iweħħlu: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2) b'xibka tan-najlon	Likwidi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) b'xibka tan-najlon jew mingħajr *Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon* Semisolidi: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Solidi: 25 µl H_2O (jew aktar jekk ikun hemm bżonn) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Xama': biċċa ċatta "forma ta' diska" b'dijametru ta' madwar 8 mm imqiegħda fuq it-tessut imxarrab bi 15-il µl H_2O.	Likwidi u viskuży: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2) bl-użu ta' xibka tan-najlon *Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon* Solidi: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Tax-xama'/iweħħlu: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) bl-użu ta' xibka tan-najlon	Likwidi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) bl-użu ta' xibka tan-najlon *Kompatibbiltà ta' qabel it-test tas-sustanza kimika tat-test b'xibka tan-najlon* Semisolidi: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Solidi: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (jew aktar jekk ikun hemm bżonn) Tax-xama': biċċa ċatta "forma ta' cookie" b'dijametru ta' madwar 8 mm imqiegħda fuq it-tessut imxarrab bi 15-il µl H_2O

Komponenti tal-Mudell tat-Test	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Kontroll ta' qabel għat-tnaqqis dirett tal-MTT	50 µl (likwidi) jew 20 mg (solidi)+ 2 ml MTT soluzzjoni ta' 0,3 mg/ml għal 180 ± 5 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma	50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi)+ 1 ml MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża	40 µl (likwidi) jew 20 mg (solidi)+ 1 ml MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 180± 15-il min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża	50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi)+ 1 ml MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża
Kontroll ta' qabel għall-interferenza tal-kulur	10 µl (likwidi) jew 10 mg (solidi) + 90 µl H_2O mħallta għal 15-il min f'RT → jekk is-soluzzjoni tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin	50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi) + 300 µl H_2O għal 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin	40 µl (likwidi) jew 20mg (solidi) + 300 µl H_2O mħallta għal 60 min f'RT → jekk is-sustanza kimika tat-test tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin	50 µl (likwidi) jew 25 mg (solidi) + 300 µl H_2O għal 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → jekk is-soluzzjoni tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin
Ħin u temperatura tal-esponiment	3 min, 60 min (± 5 min) u 240 min (± 10 min) F'armarju ventilat Temperatura Ambjentali (RT, 18-28°C)	3 min f'RT, u 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min f'RT, u 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min f'RT, u 60 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Tlaħliħ	25 ml 1x PBS (2 ml/xeħta)	20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS	20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS	20 darba bi fluss artab kostanti ta' 1x PBS

Komponenti tal-Mudell tat-Test	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Kontroll negattiv	50 µl soluzzjoni NaCl (9 g/l) Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment	50 µl H_2O Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment	40 µl H_2O Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment	50 µl H_2O Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment
Kontroll pożittiv	50 µl Aċidu aċetiku glaċjali Ittestjat għal 4 siegħat biss	50 µl 8N KOH Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment	40 µl 8N KOH Ittestjat għal siegħa (1) biss	50 µl 8N KOH Ittestjat b'kull ħin tal-esponiment
Soluzzjoni tal-MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Ħin u temperatura tal-inkubazzjoni tal-MTT	180 min (± 15-il min) f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15-il min) f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min f'37°C, 5 % CO_2, 95 % RH
Solvent ta' estrazzjoni	500 µl isopropanol aċidifikat (0,04 N HCl fl-isopropanol) (tessut iżolat mgħaddas għalkol-lox)	2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)	1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)	2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)
Ħin u temperatura tal-estrazzjoni	Matul il-lejl f'RT, bi protezzjoni mid-dawl	Matul il-lejl mingħajr tħawwid f'RT jew għal 120 min bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT	Matul il-lejl mingħajr tħawwid f'RT jew għal 120 min bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT	Matul il-lejl mingħajr tħawwid f'RT jew għal 120 min bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT

Komponenti tal-Mudell tat-Test	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Qari tal-OD	570 nm (545 - 595 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	570 nm (jew 540 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	570 nm (540 - 600 nm) mingħajr filtru ta' riferiment	540 - 570 nm mingħajr filtru ta' riferiment
Kontroll tal-Kwalità tat-Tessuti	trattament ta' 18-il siegħa b'SDS 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Trattament b'1 % Triton X-100 4,08 sigħat ≤ ET_{50} ≤ 8,7 sigħat	Trattament b'1 % Triton X-100 4,0 sigħat ≤ ET_{50} ≤ 10,0 sigħat	Trattament b'1 % Triton X-100 2,0 sigħat ≤ ET_{50} ≤ 7,0 sigħat
Kriterji ta' Aċċettabbiltà	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (NaC1) għandha tkun ≥ 0,6 u ≤ 1,5 għal kull ħin tal-esponiment 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 4 sigħat bil-kontroll pożittiv (aċidu aċetiku glaċjali), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun ≤ 20 % 3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs ≥ 0,3, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H_2O) għandha tkun ≥ 0,8 u ≤ 2,8 għal kull ħin tal-esponiment 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 15 % 3. Fil-medda ta' 20 - 100 % vijabbiltà, il-Koeffiċjent ta' Varjazzjoni (CV) bejn ir-repliki tat-tessuti għandha tkun ta' ≤ 30 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H_2O) għandha tkun ≥ 0,8 u ≤ 3,0 għal kull ħin tal-esponiment 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) (u 4 sigħat, jekk applikabbli) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 15 % 3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs ≥ 0,3, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv (H_2O) għandha tkun ≥ 0,8 u ≤ 2,8 għal kull ħin tal-esponiment 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal siegħa (1) bil-kontroll pożittiv (8N KOH), espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 20 % 3. Fil-medda ta' 20-100 % vijabbiltà u għall-ODs ≥ 0,3, id-differenza tal-vijabbiltà bejn iż-żewġ repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-30 %

Appendiċi 3

PRESTAZZJONI TAL-MUDELLI TAT-TEST GĦAS-SUBKATEGORIZZAZZJONI

It-tabella ta' hawn taħt tipprovdi l-prestazzjoni tal-erba' mudelli tat-test ikkalkolati fuq il-bażi ta' sett ta' 80 sustanza kimika ttestjati mill-erba' żviluppaturi tat-test. Il-kalkoli saru mis-Segretarjat tal-OECD, u ġew rieżaminati u miftiehma minn subgrupp ta' esperti (21) (23).

Il-mudelli tat-test EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ u epiCS® jistgħu jiġu subkategorizzati (jiġifieri 1A kontra 1B-u-1C kontra NC)

Il-prestazzjonijiet, ir-rati ta' sovraklassifikazzjoni, ir-rati ta' sottoklassifikazzjoni, u l-preċiżjoni (Kapaċità ta' tbassir) tal-erba' mudelli tat-test fuq il-bażi ta' sett ta' 80 sustanza kimika lkoll ittestjati fuq żewġ jew tliet sessjonijiet f'kull mudell tat-test:

STATISTIKI DWAR IT-TBASSIRIET MIKSUBA FUQ IS-SETT SĦIĦ TA' SUSTANZI KIMIĊI

(n= 80 sustanza kimika ttestjati fuq żewġ sessjonijiet indipendenti għal epiCS® jew tliet sessjonijiet indipendenti għal EpiDerm™ SCT, għal EpiSkin™ u għal SkinEthic™ RHE, jiġifieri rispettivament 159 (*) jew 240 klassifikazzjoni)

	EpiSkin™	EpiDerm ™	SkinEthic™	epiCS®
Sovraklassifikazzjonijiet:				
1B-u-1C 1A sovraklassifikati	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
1B-u-1C sovraklassifikati NC	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
1A sovraklassifikati NC	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Korr. sovraklassifikata	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Rata globali ta' sovraklassifikazzjoni (il-kategoriji kollha)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Sottoklassifikazzjonijiet:				
1A 1B-u-1C sottoklassifikati	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A NC sottoklassifikati	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
NC sottoklassifikati 1B-u-1C	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Rata globali ta' sottoklassifikazzjoni (il-kategoriji kollha)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Klassifikazzjonijiet Korretti:				
1A klassifikati kif suppost	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
1B-u-/1C klassifikati kif suppost	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
NC klassifikati kif suppost	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Preċiżjoni Ġenerali	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

NC: Mhux korrużivi

(*) sustanza kimika minnhom ġiet ittestjata darba f'epiCS® minħabba ebda disponibbiltà (23)

Appendiċi 4

PARAMETRI EWLENIN U KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI GĦALL-KWALIFIKAZZJONI TA' SISTEMA TAL-ISPETTROFOTOMETRU TA' HPLC/UPLC GĦALL-KEJL TAL-FORMAŻAN MTT ESTRATT MIT-TESSUT TAL-RHE

Parametru	Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (37)(38)	Kriterji tal-Aċċettazzjoni
Selettività	Analiżi tal-isopropanol, inbjank ħaj (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE ħajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE maqtula mingħajr ebda trattament)	$Area_{interference}$ ≤ 20 % ta' $Area_{LLOQ}$ ([1])
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità (jiġifieri formażan MTT f'1,6 μg/ml, 16 μg/ml u 160 μg/ml) fl-isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Effett tal-Matriċi	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=5)	85 % ≤ Effett tal-Matriċi % ≤ 115 %
Riport	Analiżi tal-isopropanol wara $ULOQ^2$ ([2]) standard	$Area_{interference}$ ≤ 20 % tal-$Area_{LLOQ}$
Riproduċibbiltà (dakinhar)	3 kurvi ta' kalibrazzjoni indipendenti (fuq il-bażi ta' 6 dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekuttivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jiġifieri 200 μg/ml); Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	Kurvi ta' Kalibrazzjoni: %Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ Kontrolli tal-Kwalità: %Dev ≤ 15 % u CV ≤ 15 %
Riproduċibbiltà (bejn ġranet differenti)	Jum 1: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 2: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 3: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)	
Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' ħżin f'temperatura ambjentali	%Dev ≤ 15 %
Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE, jekk meħtieġa	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' ħżin f'temperatura speċifikata (eż. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %"

([1]) LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jiġifieri 0,8 μg/ml.
([2]) ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi, jiġifieri 200 μg/ml.

(7) Fil-Parti B, il-Kapitolu B.46 hu sostitwit b'dan li ġej:

"*B.46* **IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-*EPIDERMIS* UMAN RIKOSTITWIT**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 439 tal-OECD (2015). L-irritazzjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irriversibbli għall-ġilda wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal massimu ta' 4 siegħat [kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU)](1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1]). Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi proċedura *in vitro* li tista' tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi kimiċi irritanti (sustanzi u taħlitiet) f'konformità mal-GHS tan-NU/mal-Kategorija 2 tas-CLP (2). Fir-reġjuni li ma jadottawx il-Kategorija 3 tal-GHS tan-NU (irritanti ħfief), dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża wkoll biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi mhux klassifikati. Għaldaqstant, skont il-qafas regolatorju u s-sistema ta' klassifikazzjoni użati, dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża biex tiġi determinata l-irritazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi jew bħala test sostitut awtonomu għall-ittestjar tal-irritazzjoni tal-ġilda *in vivo* jew bħala test sostitut parzjali fi ħdan strateġija ta' ttestjar (3).

2. Il-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda tipikament involviet l-użu ta' annimali tal-laboratorju [TM B.4, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD oriġinarjament adottata fl-1981, u riveduta fl-1992, fl-2002 u fl-2015] (4). Għall-ittestjar tal-korrużività, ġew adottati tliet metodi ta' ttestjar *in vitro* validati bħala EU TM B.40 (ekwivalenti għat-TG 430 tal-OECD), it-TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) u t-TM B.65 (ekwivalenti għat-TG 435 tal-OECD) tal-OECD (5) (6) (7). Dokument ta' gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Korrużjoni u għall-Irritazzjoni tal-Ġilda jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u jipprovdi gwida dwar (i) kif tintegra u tuża *data* eżistenti tat-testijiet u mhux tat-testijiet għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri (3).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-irritazzjoni tal-ġilda tal-punt ta' tmiem tas-saħħa umana. Hu bbażat fuq is-sistema ta' ttestjar *in vitro* tal-*epidermis* uman rikostitwit (RhE), li jimita mill-qrib il-proprjetajiet bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-partijiet superjuri tal-ġilda umana, jiġifieri l-*epidermis*. Is-sistema tat-test tal-RhE tuża keratinoċiti mhux trasformati derivati mill-bniedem bħala sors ta' ċelloli biex tirrikostitwixxi mudell epidermali b'istoloġija u b'ċitoarkitettura rappreżentattivi. Hemm Standards tal-Prestazzjoni (PS) disponibbli biex jiffaċilitaw il-validazzjoni u l-valutazzjoni ta' metodi ta' ttestjar tal-RhE simili u modifikati, f'konformità mal-prinċipji tad-dokument ta' gwida tal-OECD Nru 34 (8) (9). Il-linja gwida korrispondenti oriġinarjament ġiet adottata fl-2010, aġġornata fl-2013 biex tinkludi mudelli tal-RhE, u ġiet aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tintroduċi l-użu ta' proċedura alternattiva għall-kejl tal-vijabbiltà.

4. Tlestew studji ta' qabel il-validazzjoni, dwar l-ottimizzazzjoni u l-validazzjoni għal erba' mudelli tat-test *in vitro* disponibbli kummerċjalment (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) fuq il-bażi tas-sistema ta' ttestjar tal-RhE (sensittività 80 %, speċifiċità 70 %, u preċiżjoni 75 %). Dawn l-erba' mudelli tat-test huma inklużi f'din it-TM u huma elenkati fl-Appendiċi 2, li jipprovdi wkoll informazzjoni dwar it-tip ta' studju ta' validazzjoni użat għall-validazzjoni tal-metodi ta' ttestjar rispettivi. Kif innotat fl-Appendiċi 2, il-Metodu ta' Referenza Validat (VRM) intuża biex jiġu żviluppati l-metodu ta' ttestjar preżenti u l-Istandards tal-Prestazzjoni (8).

5. L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD tkun garantita biss għall-mudelli tat-test validati skont l-Istandards tal-Prestazzjoni (8), jekk dawn il-mudelli tat-test ikunu ġew rieżaminati u adottati mill-OECD. Il-mudelli tat-test inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar u t-TG korrispondenti tal-OECD jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-riżultati tat-testijiet mill-metodi ta' ttestjar *in vitro* għall-irritazzjoni tal-ġilda, filwaqt li jibbenefikaw mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data*.

6. Id-definizzjonijiet tat-termini użati f'dan id-dokument huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Limitazzjoni tal-metodu ta' ttestjar, kif muri mill-istudju ta' validazzjoni prospettiv sħiħ li jivvaluta u jikkaratterizza l-metodi ta' ttestjar tal-RhE (16), hi li dan ma jipermettix il-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi għall-Kategorija 3 tal-GHS tan-NU (irritanti ħfief) (1). B'hekk, il-qafas regolatorju fil-pajjiżi membri se jiddeċiedi kif se jintuża dan il-metodu ta' ttestjar. Għall-UE, il-Kategorija 3 ma ntużatx fis-CLP. Għal evalwazzjoni sħiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermali wieħed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (3). Hu rikonoxxut li l-użu ta' ġilda umana hu soġġett għal konsiderazzjonijiet u għal kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-irritazzjoni tal-ġilda tal-punt ta' tmiem tas-saħħa umana. Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar il-korrużjoni tal-ġilda, ta' min jinnota t-TM B.40bis (ekwivalenti għat-TG 431 tal-OECD) dwar il-korrużjoni tal-ġilda hu bbażat fuq l-istess sistema tat-test tal-RhE, għalkemm juża protokoll ieħor (6). Dan il-metodu ta' ttestjar hu bbażat fuq il-mudelli tal-RhE billi jintużaw keratinoċiti umani, li għaldaqstant jirrappreżentaw b'mod *in vitro* l-organu fil-mira tal-ispeċi ta' interess. Barra minn hekk, dan ikopri direttament il-pass inizjali tal-katina/mekkaniżmu infjammatorja/u tal-azzjoni (ħsara liċ-ċelloli u lit-tessut li tirriżulta fi trawma lokalizzata) li sseħħ/jseħħ waqt l-irritazzjoni *in vivo*. Ġiet ittestjata firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi fil-validazzjoni li hi l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar u l-bażi ta' *data* tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 58 sustanza kimika (16) (18) (23). Il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għas-solidi, għal-likwidi, għas-semisolidi u għax-xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu miħuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda pretrattament ieħor tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx eżaminati fi studju ta' validazzjoni (29). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

9. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Madankollu, minħabba l-fatt li t-taħlitiet ikopru spettru mifrux ta' kategoriji u ta' kompożizzjoni, u li bħalissa hemm disponibbli biss informazzjoni limitata dwar l-ittestjar tat-taħlitiet, f'każijiet li fihom tkun tista' tintwera evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar għal kategorija speċifika ta' taħlitiet (*eż.* skont strateġika kif proposta f'Eskes *et al.*, 2012 (30)), il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dik il-kategorija speċifika ta' taħlitiet. Għandha tingħata attenzjoni speċjali f'każ li klassijiet speċifiċi ta' sustanzi kimiċi jew proprjetajiet fiżikokimiċi jinstab li ma jkunux applikabbli għall-metodu ta' ttestjar kurrenti.

10. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejlijiet tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet (ara l-paragrafi 28-34).

11. Sessjoni waħda ta' ttestjar magħmula minn tliet tessuti rreplikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew il-vijabbiltà perċentwali medja ugwali għal 50 ± 5 %, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Is-sustanza kimika tat-test hi applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, ifformata minn keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-epidermis uman, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermis* uman. Din tikkonsisti f'saff tal-qieħ, saff spinuż u saff granulari organizzati, u *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellolari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analogu għal dawk li jinstabu *in vivo*.

13. Irritazzjoni tal-ġilda indotta b'sustanza kimika, murija primarjament b'eritema u edema, hi r-riżultat ta' kaskata ta' avvenimenti li jibdew bil-penetrazzjoni tas-sustanzi kimiċi permezz tal-*istratum corneum* fejn dawn jistgħu jagħmlu ħsara lis-saffi sottostanti tal-keratinoċiti u lil ċelloli oħra tal-ġilda. Iċ-ċelloli li jġarrbu ħsara jistgħu jeħilsu medjaturi infjammatorji jew inkella jinduċu kaskata infjammatorja li wkoll taġixxi fuq iċ-ċelloli fid-*dermis*, b'mod partikolari ċ-ċelloli stromali u edoteljali tal-važi. Hi d-dilazzjoni u l-permeabbiltà akbar taċ-ċelloli endoteljali li jipproduċu l-eritema u l-edema osservati (29). B'mod partikolari, il-metodi ta' ttestjar bbażati fuq l-RhE, fin-nuqqas ta' kwalunkwe vaskolarizzazzjoni fis-sistema ta' ttestjar *in vitro*, ikejlu l-avvenimenti tal-bidu fil-kaskata, eż. ħsara fiċ-ċelloli / fit-tessuti (16) (17), bl-użu tal-vijabbiltà bħala readout.

14. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli fil-mudelli tal-RhE titkejjel b'konverżjoni enzimatika tal-kulurant vitali MTT [bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5- difeniltetrażolju, blu tjażolil; Numru CAS 298-93-1], f'melħ tal-formażan blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (31). Sustanzi kimiċi irritanti huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà taċ-ċelloli taħt il-livelli limitu definiti (jiġifieri ≤ 50 %, għall-GHS tan-NU/għall-Kategorija 2 tas-CLP). Skont il-qafas regolatorju u l-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar, is-sustanzi kimiċi li jipproduċu l-vijabbiltajiet taċ-ċelloli ogħla mil-livell massimu definit, jistgħu jitqiesu bħala mhux irritanti (jiġifieri > 50 %, L-Ebda Kategorija).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

15. Qabel l-użu ta' rutina ta' kwalunkwe wieħed mill-erba' metodi ta' ttestjar validati li jaderixxu ma' dan il-metodu ta' ttestjar (Appendiċi 2), il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika, billi jużaw l-għaxar Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom, pereżempju, sustanza elenkata ma tkunx disponibbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. millista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (8)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1. L-użu ta' sustanza ta' profiċjenza alternattiva għandu jkun ġustifikat.

16. Bħala parti mill-ittestjar tal-profiċjenza, hu rrakkomandat li l-utenti jivverifikaw il-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-mudell tal-RhE. Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu ta' ttestjar ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun inkisbet u ntweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu ta' ttestjar b'rutina, hu rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

Tabella 1

Sustanzi ta' Profiċjenza [1]

Sustanza	NRU CAS	Punteġġ *in vivo* [2]	Stat fiżiku	Kategorija tal-GHS tan-NU
SUSTANZI MHUX KLASSIFIKATI (Nru tal-Kategorija tal-GHS tan-NU)				
aċidu naftalenaċetiku	86-87-3	0	Solidu	Ebda Kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Likwidi	Ebda Kat.
stearat tal-metil	112-61-8	1	Solidu	Ebda Kat.
butirat tal-ettil	5870-93-9	1,7	Likwidi	Ebda Kat. (*Kat. 3 Fakultattiva 3*) [3]
saliċilat tal-eżil	6259-76-3	2	Likwidi	Ebda Kat. (*Kat. 3 Fakultattiva 3*) [3]
SUSTANZI KLASSIFIKATI (Kategorija 2 tal-GHS tan-NU)				
aldeid taċ-ċiklamen	103-95-7	2,3	Likwidi	Kat. 2
1-bromoeżan	111-25-1	2,7	Likwidi	Kat. 2
idrossidu tal-potassju (5 % soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	3	Likwidi	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperażina	5271-27-2	3,3	Solidu	Kat. 2
ħeptanal	111-71-7	3,4	Likwidi	Kat. 2

[1] Is-Sustanzi ta' Profiċjenza huma subsett tas-sustanzi użati fl-istudju ta' validazzjoni u l-għażla hi bbażata fuq il-kriterji li ġejjin; (i), is-sustanzi kimiċi jkunu kummerċjalment disponibbli; (ii), dawn ikunu rappreżentattivi tal-medda sħiħa tal-punteġġi ta' irritazzjoni ta' Draize (minn mhux irritanti sa irritanti ħafna); (iii), ikollhom struttura kimika definita sew; (iv) ikunu rappreżentattivi tal-funzjonalità kimika użata fil-proċess ta' validazzjoni; (v) ikunu pprovdew riżultati *in vitro* riproduċibbli f'diversi testijiet u f'diversi laboratorji; (vi) ikunu ġew imbassra kif suppost *in vitro*, u (vii) ma jkunux assoċjati ma' profil estremament tossiku (eż. karċinoġeniku jew tossiku għas-sistema riproduttiva) u ma jkunux assoċjati ma' kostijiet projbittivi għar-rimi.

[2] Punteġġ *in vivo* skont it-TM B.4 (4).

[3] Skont dan il-metodu ta' ttestjar, il-Kategorija 3 (irritanti ħfief) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1) hi meqjusa bħala L-Ebda Kategorija.

PROĊEDURA

17. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ta' metodu ta' ttestjar tal-RhE għall-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda (Ara wkoll l-Appendiċi 3 għall-parametri relatati ma' kull mudell tat-test). Il-Proċeduri Operatorji Standard (SOPs) għall-erba' mudelli li jikkonformaw ma' dan il-metodu ta' ttestjar huma disponibbli (32) (33) (34) (35).

KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHE

Kundizzjonijiet ġenerali

18. Għandhom jintużaw keratinoċiti umani mhux trasformati biex jerġgħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegħ, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taħt *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali biex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi, *eż.* dodeċilsulfat tas-sodju (SDS) jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika referenzjarja tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment meħtieġ sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50 % (IC_{50}) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika referenzjarja b'konċentrazzjoni speċifika u fissa. Il-karatteristiċi ta' trażżin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-*istratum corneum* għat-tessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun ħieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

Kundizzjonijiet funzjonali

Vijabbiltà

19. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà hu l-assaġġ MTT (31). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhE jistgħu jnaqqsu l-MTT tal-kulurant vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). Id-densità ottika (OD) tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun ¿għira bi¿¿ejjed, jiġifieri OD < 0,1. L-MTT forma¿an estratt jista' jiġi kwantifikat bl-u¿u ta' kejl tal-assorbanza standard (OD) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (36). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom ji¿guraw li kull lott mill-mudell tal-RhE u¿at jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-Irritazzjoni tal-Ġilda) tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Meded tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tal-RhE validati inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar huma mogħtija fit-Tabella 2. Utent tal-Ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv huma stabbli fil-koltura (jipprovdu kejl tal-vijabbiltà simili) sakemm idum il-perjodu ta' esponiment tat-test.

Tabella 2

>Meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontrolli negattivi tal-mudelli tat-test inklużi f'dan it-TM

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Funzjoni ta' protezzjoni

20. L-*istratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed biex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi referenzjarji ċitotossiċi, *eż.* SDS jew Triton X-100, kif stmat minn IC_{50} jew ET_{50} (Tabella 3).

Morfoloġija

21. Għandu jiġi pprovdut eżami istoloġiku tal-mudell tal-RhE li juri struttura li tixbah l-*epidermis* uman (inkluż l-*istratum corneum* b'saffi multipli).

Riproduċibbiltà

22. Ir-riżultati tal-kontrolli pożittivi u negattivi tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà maż-żmien.

Kontroll tal-kwalità (QC)

23. Il-mudell tal-RhE għandu jintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-*vijabbiltà* (paragrafu 17), għall-*funzjoni ta' protezzjoni* (paragrafu 18) u għall-*morfoloġija* (paragrafu 19) huma l-aktar rilevanti. Din id-*data* għandha tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar, biex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Medda tal-aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-IC_{50} jew għall-ET_{50} għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE. Dawk ir-riżultati li huma prodotti b'tessuti kkwalifikati biss jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli ta' klassifikazzjoni tal-irritazzjoni. Il-meded tal-aċċettabbiltà għall-erba' mudelli tat-test inklużi f'dan it-TM huma mogħtija fit-Tabella 3.

Tabella 3

Il-kriterji tar-rilaxx tal-lott tal-QC tal-mudelli tat-test inklużi f'dan it-TM

	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiSkin™ (SM) (trattament ta' 18-il siegħa b' SDS) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 8,7 hr
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 10,0 hr
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (trattament ta' 18-il siegħa b' SDS) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

Applikazzjoni tas-Sustanza Kimika tat-Test u tas-Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

24. Tal-anqas għandhom jintużaw tliet repliki għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli f'kull sessjoni. Għas-sustanzi kimiċi likwidi kif ukoll għas-sustanzi kimiċi solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test biex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-*epidermis* filwaqt li tiġi evitata doża infinita, jiġifieri tvarja minn 26 sa 83 µl/cm^2 jew mg/cm^2 (ara l-Appendiċi 3). Għas-sustanzi kimiċi solidi, il-wiċċ tal-*epidermis* għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni, biex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u s-superfiċje tal-*epidermis*. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. F'ċerti każijiet tista' tintuża xibka tan-najlon bħala għajnuna għat-tifrix (ara l-Appendiċi 3). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinħasel bir-reqqa mill-*epidermis* b'superfiċje b'bafer milwiem, jew b'0,9 % NaCl. Skont il-mudelli tat-test tal-RhE użati, il-perjodu ta' esponiment ivarja bejn 15-il minuta u 60 minuta, u t-temperatura ta' inkubazzjoni bejn 20 u 37 °C. Dawn il-perjodi ta' esponiment u t-temperaturi huma ottimizzati għal kull metodu ta' ttestjar tal-RhE individwali u jirrappreżentaw il-proprjetajiet intrinsiċi differenti tal-mudelli tat-test (*eż.* il-funzjoni ta' protezzjoni) (ara Appendiċi 3).

25. F'kull sessjoni għandhom jintużaw kontroll negattiv (NC) u kontroll pożittiv (PC) konkorrenti biex jintwera li l-vijabbiltà (bl-użu tal-NC), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessuti li tirriżulta (bl-użu tal-PC) jinsabu fi ħdan medda ta' aċċettazzjoni storika definita. Il-PC suġġerit hu ta' SDS 5 % milwiemi. L-NCs suġġeriti huma ilma jew salina bbaferjata bil-fosfat (PBS).

Kejlijiet tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

26. Skont il-proċedura tat-test, hu essenzjali li l-kejl tal-vijabbiltà ma jsirx immedjatament wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test, iżda wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament twil biżżejjed tat-tessut imlaħlaħ f'medium ġdid. Dan il-perjodu jippermetti kemm l-irkupru minn effetti ċitotossiċi dgħajfa kif ukoll il-manifestazzjoni tal-effetti ċitotossiċi b'mod ċar. Perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament ta' 42 siegħa nstab li kien ottimali matul l-ottimizzazzjoni tat-test ta' tnejn mill-mudelli tat-test ibbażati fuq l-RhE li huma l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar (11) (12) (13) (14) (15).

27. L-assaġġ tal-MTT hu metodu kwantitattiv standardizzat li għandu jintuża biex ikejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli taħt dan il-metodu ta' ttestjar. Hu kompatibbli mal-użu f'bini ta' tessut tridimensjonali. Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni tal-MTT b'konċentrazzjoni xierqa (*eż.* 0,3 jew 1 mg/ml) għal tliet sigħat. L-MTT jiġi kkonvertit f'formażan blu miċ-ċelloli vijabbli. Imbagħad il-prodott preċipitat formażan blu jiġi estratt mit-tessuti permezz ta' solvent (e.g., isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażan titkejjel billi tiġi determinata l-OD f'570 nm permezz ta' filtru band pass sa massimu ta' ±30 nm, jew bl-użu ta' proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafu 34) (36).

28. Il-proprjetajiet ottiċi tas-sustanza kimika tat-test jew l-azzjoni kimika tagħha fuq l-MTT (eż. is-sustanzi kimiċi jistgħu jipprevjenu jew ireġġgħu lura l-ġenerazzjoni tal-kulur kif ukoll jikkawżawha) jistgħu jinterferixxu mal-assaġġ u jwasslu għal stima falza tal-vijabbiltà. Dan jista' jseħħ meta sustanza kimika tat-test speċifika ma titneħħiex kompletament mit-tessut bi tlaħliħ jew meta din tippenetra l-*epidermis*. Jekk sustanza kimika tat-test taġixxi direttament fuq l-MTT (*eż.* riduċenti tal-MTT), ikollha kulur naturali, jew issir ikkulurita matul it-trattament tat-tessut, għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex jiġu identifikati u kkoreġuti l-interferenzi tas-sustanzi kimiċi tat-test mat-teknika ta' kejl tal-vijabbiltà (ara l-paragrafi 29 u 33). Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs għall-erba' mudelli validati inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar (32) (33) (34) (35).

29. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tiżdied ma' soluzzjoni MTT preparata ġdida. Jekk it-taħlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod dirett l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq it-tessuti tal-RhE mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali tħaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu s-sustanza kimika tat-test b'mod simili bħal tessuti vijabbli. Kull sustanza kimika tat-test li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula li ssirilhom il-proċedura sħiħa ta' ttestjar biex jiġi ġġenerat tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Kontroll tal-NSMTT wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa. Imbagħad, il-vijabbiltà tat-tessuti veru tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għar-riduċent tal-MTT nieqes it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess riduċent tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSMTT).

30. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti jew mis-sustanzi kimiċi tat-test li jitlewnu meta jidħlu f'kuntatt mal-ilma jew mal-isopropanol u tittieħed deċiżjoni dwar il-ħtieġa ta' kontrolli addizzjonali, għandha ssir analiżi spettrali tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma (ambjent matul l-esponiment) u/jew fl-isopropanol (soluzzjoni tal-estrazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi d-dawl fil-medda ta' 570 ± 30 nm, għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-kolorant jew inkella għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 33 u 34). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test imlewna li tinterferixxi tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli, li ssirilhom il-proċedura sħiħa ta' ttestjar iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku (NSC_{living}). Il-kontroll tal-NSC_{living} irid jitwettaq fl-istess ħin bħall-ittestjar tas-sustanza kimika tat-test ikkulurita u f'każ ta' ttestjar multiplu, irid jitwettaq kontroll indipendenti tal-NSC_{living} li għandu jsir b'kull test imwettaq (f'kull sessjoni) minħabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT nieqes il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC_{living}).

31. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 29) u interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 30) se jkunu jeħtieġu t-tielet sett ta' kontrolli wkoll, minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC_{living} deskritti fil-paragrafi ta' qabel, meta jitwettaq il-kejl tal-assorbanza standard (OD). Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti skuri li jinterferixxu mal-assaġġ tal-MTT (eż. blu, vjola, suwed) minħabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 29. Dawn is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jitgħaqqdu kemm ma' tessuti ħajjin kif ukoll ma' dawk maqtula u, għalhekk, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss

għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test, iżda anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC_{living} diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mit-tgħaqqid tas-sustanza kimika tat-test mat-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSC_{killed}). F'dan il-kontroll addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula, li ssirilhom il-proċedura tal-ittestjar sħiħa iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC_{killed} wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa, iżda għandu jsir fl-istess ħin mal-kontroll tal-NSMTT u, fejn possibbli, bl-istess lott ta' tessuti. Imbagħad il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT nieqes il- $\%NSC_{living}$ flimkien mal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut ($\%NSC_{killed}$).

32. Ta' min jinnota li t-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku u l-interferenzi tal-kulur mhux speċifiku jistgħu jżidu l-kejl tal-estratt tat-tessut f'livell ogħla mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-bażi, kull laboratorju għandu jiddetermina l-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru tiegħu bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7) minn sors kummerċjali qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji. Il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu tal-ispettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur meta l-ODs tal-estratti tat-tessuti miksuba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal tnaqqis dirett tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi ħdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru jew meta l-vijabbiltà perċentwali mhux ikkoreġuta miksuba bis-sustanza kimika tat-test diġà tkun ≤ 50 %. Minkejja dan, ir-riżultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew $\%NSC_{living}$ ≥ 50 % tal-kontroll negattiv għandhom jittieħdu b'attenzjoni peress li dan hu l-limitu użat biex jiġu distinti s-sustanzi kimiċi klassifikati minn dawk mhux klassifikati (ara l-paragrafu 36).

33. Għal sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti li ma jkunux kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) minħabba interferenza qawwija wisq mal-assaġġ MTT, tista' titħaddem il-proċedura alternattiva tal-ispettrofotometrija HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafu 34) (36). Is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika tat-test qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (36). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC_{living} jew tal-NSC_{killed} qatt ma jkunu meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta waħda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas b'mod dirett l-MTT jew ikollha kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità ta' tnaqqis dirett tal-MTT (kif deskritt fil-paragrafu 29). Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala l-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test nieqes il- %NSMTT. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT li jistgħu jkunu interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal Ods (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-ogħla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma jistgħux jiġu vvalutati, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħħu f'sitwazzjonijiet rari ħafna biss.

34. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża wkoll bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażan MTT (36). Minħabba d-diversità tas-sistemi tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' dawk deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bijoanaliticiċi (36)(37). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 4. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 4, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażan MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

35. Għal kull metodu ta' ttestjar li juża lottijiet tal-mudell tal-RhE validi (ara l-paragrafu 23), it-tessuti ttrattati bil-kontroll negattiv għandhom jimmanifestaw OD li tirrefletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-passi ta' kunsinna u riċevuta u l-proċessi kollha tal-protokoll. Il-valuri ta' kontroll tal-OD ma għandhomx ikunu aktar baxxi mil-limiti storikament stabbiliti. B'mod simili, it-tessuti trattati bil-PC, jiġifieri SDS 5 % milwiema, għandhom jirriflettu l-ħila tagħhom li jwieġbu għal sustanza kimika irritanti taħt il-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (ara l-Appendiċi 3 u għal aktar informazzjoni l-SOPs tal-erba' mudelli tat-test inklużi f'din it-TG (32) (33) (34) (35)). Il-kejlijiet assoċjati u xierqa tal-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti, jiġifieri d-devjazzjonijiet standard (SD) għandhom jaqgħu fi ħdan il-limiti tal-aċċettazzjoni stabbiliti għall-mudell tat-test użat (ara l-Appendiċi 3).

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir

36. Il-valuri tal-OD miksuba minn kull sustanza kimika tat-test jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' vijabbiltà normalizzat għall-kontroll negattiv, li hu stabbilit għal 100 %. F'każ li tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Il-valur ta' limitu tal-perċentwal tal-vijabbiltà ta' ċellola li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test irritanti minn dawk mhux klassifikati u l-proċedura/i statistika/statistiki użata/i biex jiġu evalwati r-riżultati u jiġu identifikati s-sustanzi kimiċi irritanti għandhom jiġu ddefiniti u dokumentati b'mod ċar u għandu jintwera li dawn huma xierqa (ara l-SOPs tal-mudelli tat-test għal informazzjoni). Il-valuri ta' limitu għat-tbassir tal-irritazzjoni huma pprovduti hawn taħt:

— Is-sustanza kimika tat-test hi identifikata bħala waħda li teħtieġ klassifikazzjoni u tikkettar skont il-GHS tan-NU/is-CLP (Kategorija 2 jew Kategorija 1) jekk il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali medja wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun anqas jew daqs (≤) 50 %. Peress li l-mudelli tat-test tal-RhE koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistgħux jiddistingwu bejn il-Kategoriji 1 u 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, se jkun hemm bżonn ta' informazzjoni ulterjuri dwar il-korrużjoni tal-ġilda biex jiġi deċiż dwar il-klassifikazzjoni finali tagħha [ara woll id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-IATA (3)]. Fil-każ li s-sustanza kimika tat-test tinstab li ma tkunx korrużiva (eż. ibbażata fuq it-TM.40, B.40bis jew B.65), u turi vijabbiltà tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun anqas jew daqs (≤) 50 %, is-sustanza kimika tat-test titqies li tkun irritanti għall-ġilda skont il-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/is-CLP.

— Skont il-qafas regolatorju fil-pajjiżi membri, is-sustanza kimika tat-test tista' titqies bħala mhux irritanti għall-ġilda skont L-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP jekk il-vijabbiltà tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun aktar (>) minn 50 %.

DATA U RAPPORTAR

Data

37. Għal kull sessjoni, id-*data* mit-tessuti replikati individwali (eż. valuri tal-OD u *data* dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-*data* minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-SD ± medji għal kull sessjoni. Interazzjonijiet osservati mar-reaġent u s-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti tal-MTT għandhom jiġu rrapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

Rapport tat-Test

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

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u kwalunkwe proprjetà fiżikokimika rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (*eż.*, it-tisħin, it-ħin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Il-mudell u l-protokoll tal-RhE użati (u l-ħsieb għall-għażla, jekk applikabbli)

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-mudell tal-RhE użat (inkluż in-numru tal-lott);

— Informazzjoni dwar il-kalibrazzjoni għall-apparat tal-kejl (*eż.* spettrofotometru), it-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl; Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT;

— Deskrizzjoni tal-kwantifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, jekk applikabbli; Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din l-informazzjoni għandha tiġi inkluża, iżda ma għandhiex tkun limitata għal dawn:

  i) Il-vijabbiltà;

  ii) Il-funzjoni ta' protezzjoni;

  iii) Il-morfoloġija;

  iv) Ir-riproduċibbiltà u l-prevedibbiltà;

  v) Il-kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell;

— Referenza għad-*data* storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma tkunx limitata għall-aċċettabbiltà tad-*data* tal-QC b'referenza għad-*data* tal-lottijiet storiċi.

— Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza.

Proċedura tat-Test:

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata (inklużi l-proċeduri ta' ħasil użati wara l-perjodu ta' esponiment); Doża tas-sustanza kimika tat-test u tal-kontrolli użati;

— Durata u temperatura tal-perjodu ta' esponiment u tal-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment;

— Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur, jekk applikabbli;

— In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (PC, kontroll negattiv, u NSMTT, NSC_{living} u NSC_{killed}, jekk applikabbli);

— Deskrizzjoni tal-kriterji tad-deċiżjonijiet/tal-mudell tat-tbassir applikati fuq il-bażi tal-mudell tal-RhE użat;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika fil-proċedura tat-test (inklużi l-proċeduri tal-ħasil).

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test:

— Il-valuri medji tal-kontroll pożittiv u negattiv u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika; Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test.

Ir-riżultati:

— Tabultazzjoni tad-*data* għal sustanza kimika tat-test individwali għal kull sessjoni u kull kejl tar-repliki inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti u l-SD;

— Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur inklużi l-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, SD, il-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessuti;

— Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bil-kontrolli b'rabta mas-sessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

— Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, NU New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Dikjarazzjoni dwar il-"Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC31), 9 ta' April 2009. Disponibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(4) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermali Akuta.

(5) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Ir-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER).

(6) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit (RHE).

(7) Kapitolu B.65 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Barriera tal-Membrana *In Vitro*.

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. u Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. u Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. u Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. u Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. u Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. u Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. u Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. u Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. u Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

(20) EURL-ECVAM (2007). Dikjarazzjoni dwar il-Validità tat-Testijiet *In Vitro* għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC26), 27 ta' April 2007. Disponibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. Dawn huma l-PS oriġinali użati għall-validazzjoni taż-żewġ metodi ta' ttestjar. Dawn il-PS ma għandhomx jibqgħu jintużaw peress li issa hemm verżjoni aġġornata (8) disponibbli.*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Dikjarazzjoni dwar il-Validità Xjentifika tat-Testijiet *In Vitro* għall-Irritazzjoni tal-Ġilda, Maħruġa mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC29), 5 ta' Novembru 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. u Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. u Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. u Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. u Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(32) EpiSkin™ (Frar 2009). SOP, Verżjoni 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Riveduta Marzu 2009). SOP, Verżjoni 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (Ġunju 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., u McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Il-manuskritt għadu qed jitħejja.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mejju 2001. Disponibbli fuq: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., u Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, fi: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. Din hi l-verżjoni kurrenti tal-PS tal-ECVAM, aġġornata fl-2009 fid-dawl tal-implimentazzjoni tal-GHS tan-NU. Dawn il-PS ma għandhomx jibqgħu jintużaw peress li issa hemm verżjoni aġġornata (8) disponibbli relatata mat-TG preżenti.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). Dikjarazzjoni tal-ESAC dwar l-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) għall-Ittestjar tal-Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro* bl-użu ta' Epidermis Uman Rikostitwit, Maħruġa mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC31), 8 ta' Lulju 2009.

(41) KE (2001). Id-Direttiva tal-kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awwissu 2001 li taddatta għall-progress tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikolużi, il-*Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea* L225, 1-333.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' konkordanza biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (9).

Vijabbiltà taċ-ċelloli: Il-parametru li jkejjel l-attività sħiħa tal-popolazzjoni ċellulari *eż.* il-kapaċità tad-deidroġenaži mitokondrijali ċellulari biex titnaqqas is-sustanza koloranti vitali MTT ([bromur tat-3-(4,5-Dimetiltijażol l-2-il)-2,5-difeniltetrażolju, blu tijażolil;), li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, tikkorrispondi għall-għadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

Sustanza kimika: tfisser sustanza jew taħlita.

Konkordanza: Dan hu kejl tal-prestazzjoni għal mudelli tat-test li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (9).

ET_{50}: Jista' jiġi stmat bid-determinazzjoni tal-ħin tal-esponiment meħtieġ biex il-vijabbiltà taċ-ċelloli titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika ta' riferiment f'konċentrazzjoni speċifikata fissa, ara wkoll IC_{50}.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi min-Nazzjonijiet Uniti (NU)): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

HPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja.

IATA: Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

IC_{50}: Tista' tiġi stmata bid-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, ara wkoll ET_{50}.

Doża infinita: Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-*epidermis* lil hinn mill-ammont meħtieġ biex tinkesa b'mod sħiħ u uniformi s-superfiċje tal-*epidermis*.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

MTT: Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

NSC_{killed}: Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

NSC_{living}: Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti ħajjin.

NSMTT: Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

Standards tal-prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (9).

PC: Kontroll Pożittiv, Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza kimika li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (9).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (9).

Test ta' sostituzzjoni: Test li hu mfassal biex jieħu post test li hu f'użu ta' rutina u aċċettat għall-identifikazzjoni tal-perikli u/jew għall-valutazzjoni tar-riskji, u li ġie determinat li jipprovdi protezzjoni ekwivalenti jew imtejba tas-saħħa tal-bniedem jew tal-annimali jew tal-ambjent, skont kif ikun applikabbli, meta mqabbel mat-test aċċettat, għas-sitwazzjonijiet u għas-sustanzi kimiċi ta' ttestjar possibbli kollha (9).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' PC.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

Irritazzjoni tal-ġilda *in vivo*: Il-produzzjoni ta' ħsara riversibbli fuq il-ġilda wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test għal massimu ta' erba' sigħat. Irritazzjoni tal-ġilda hi reazzjoni lokali tat-tessut tal-ġilda affettwat u li tidher ftit wara l-istimolazzjoni (38). Hi kkawżata minn reazzjoni infjammatorja lokali li tinvolvi s-sistema immuni innata (mhux speċifika) tat-tessut tal-ġilda. Hi karatterizzata primarjament minn proċess riversibbli li jinvolvi reazzjonijiet infjammatorji u ħafna mis-sinjali karatteristiċi kliniċi ta' irritazzjoni (eritema, edema, ħakk u uġigħ) relatati mal-proċess ta' infjammazzjoni.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qed tiġi ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Ħafna.

UVCB: sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Appendiċi 2

MUDELLI TAT-TEST INKLUŻI F'DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

Nru	Isem tal-mudell tat-test	Tip ta' studju ta' validazzjoni	Referenzi
1	EpiSkin™	Studju ta' validazzjoni prospettiv sħiħ (2003-2007). Il-komponenti ta' dan il-mudell intużaw biex jiġu definiti l-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar oriġinali u aġġornat tal-PS tal-ECVAM (39) (40) (21) (*) . Barra minn hekk, id-*data* tal-metodu relatata mal-identifikazzjoni ta' sustanzi mhux klassifikati kontra dawk klassifikati fformat il-bażi ewlenija għad-definizzjoni tal-valuri tal-ispeċifiċità u tas-sensittività tal-PS oriġinali (*)	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*oriġinali*): Għall-ewwel il-mudell tat-test saritlu validazzjoni prospettiva sħiħa flimkien man-Nru 1 mill-2003-2007. Il-komponenti ta' dan il-mudell intużaw biex jiġu definiti l-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar oriġinali u aġġornat tal-PS tal-ECVAM (39) (40) (21) (*) EpiDerm™ SIT (EPI-200): Modifika tal-EpiDerm™ oriġinali ġiet validata bl-użu tal-PS oriġinali tal-ECVAM (21) fl-2008 (*)	(2) ((10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Studju ta' validazzjoni bbażat fuq l-Istandards tal-Prestazzjoni oriġinali tal-ECVAM (21) fl-2008 (*)	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Studju ta' validazzjoni (2011-2012) ibbażat fuq l-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) tat-TG 439 (8) tal-OECD li huma bbażati fuq il-PS (*) aġġornat tal-ECVAM (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) u l-PS ta' din it-TG (8) (*)

(*) L-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) oriġinali tal-ECVAM (21) ġew żviluppati fl-2007 mat-tlestija tal-istudju ta' validazzjoni prospettiv (16) li kien ivvaluta l-prestazzjoni tal-mudelli tat-test Nri 1 u 2 b'rabta mas-sistema ta' klassifikazzjoni kif deskritta fit-28 emenda tad-Direttiva tal-UE dwar is-Sustanzi Perikoluži (41). Fl-2008 ġew introdotti l-GHS tan-NU (1) u s-CLP tal-UE, li b'mod effettiv mexxew il-valur ta' limitu għad-distinzjoni bejn sustanzi mhux klassifikati u dawk klassifikati minn punteġġ *in vivo* ta' 2,0 għal 2,3. Biex jiġi adattat għal dan ir-rekwiżit regolatorju mibdul, il-valuri referenzjarji u l-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment tal-PS tal-ECVAM ġew aġġornati fl-2009 (2) (39) (40). Bħall-PS oriġinali, anki l-PS aġġornati kienu primarjament ibbażati fuq *data* mill-mudelli Nru 1 u 2 (16), iżda użaw ukoll *data* dwar is-sustanzi kimiċi ta' riferiment mill-mudell Nru 3. Fl-2010, intużaw il-PS aġġornati tal-ECVAM għall-istipular tal-PS b'rabta ma' din it-TG (8). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, EpiSkin™ hu kkunsidrat il-VRM, minħabba l-fatt li kien intuża biex jiġu żviluppati l-kriterji kollha tal-PS. Informazzjoni dettaljata dwar l-istudji ta' validazzjoni, kompilazzjoni tad-*data* ġenerata kif ukoll l-isfond għall-adattamenti neċessarji tal-PS bħala konsegwenza tal-implimentazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP jistgħu jinkisbu mid-dokument ta' spjegazzjoni ta' sfond tal-ECVAM/BfR għat-TG 439 korrispondenti tal-OECD (23).SIT: Test tal-Irritazzjoni tal-Ġilda

RHE: Epidermis Uman Rikostitwit

Appendiċi 3

PARAMETRI TAL-PROTOKOLL SPEĊIFIĊI GĦAL KULL WIEĦED MILL-MUDELLI TAT-TEST INKLUŻI F'DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

Il-mudelli tal-RhE juru protokolli simili ħafna u b'mod partikolari lkoll jużaw perjodu ta' wara l-inkubazzjoni ta' 42 siegħa (32) (33) (34) (35). Il-varjazzjonijiet jikkonċernaw primarjament tliet parametri relatati mal-funzjonijiet differenti ta' protezzjoni tal-mudelli tat-test u elenkati hawn: A) Ħin u volum ta' qabel l-inkubazzjoni, B) Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u C) Volum ta' wara l-inkubazzjoni.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Preinkubazzjoni				
Ħin ta' inkubazzjoni	18- 24 siegħa	18-24 siegħa	< sagħtejn (2)	15-30 siegħa
Volum medju	2ml	0,9 ml	0,3 jew 1ml	0,5 ml
B) Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test				
Għal likwidi	10µl (26µl/cm^2)	30µl (47µl/cm^2)	16µl (32µl/cm^2)	25µl (83µl/cm^2)
Għal solidi	10mg (26mg/cm^2) + DW (5µl)	25mg (39mg/cm^2) + DPBS (25µl)	16mg (32mg/cm^2) + DW (10µl)	25mg (83mg/cm^2) + DW (25µl)
Użu ta' xibka tan-najlon	Ma ntużatx	Jekk ikun hemm bżonn	Applikata	Ma ntużatx
Ħin totali tal-applikazzjoni	15-il minuta	60 minuta	42 minuta	15-il minuta
Temperatura tal-applikazzjoni	RT	a) f'RT għal 25 minuta b) f'37ºC għal 35 minuta	RT	RT
C) Volum ta' wara l-inkubazzjoni				
Volum medju	2 ml	0,9ml x 2	2 ml	1 ml
D) Varjabbiltà aċċettabbli massima				
Devjazzjoni standard bejn ir-repliki tat-tessuti	SD18	SD18	SD18	SD18

RT: Temperatura ambjentali
DW: ilma distillat
DPBS: Salina tal-Bafer tal-Fosfat ta' Dulbecco

Appendiċi 4

PARAMETRI EWLENIN U KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI GĦALL-KWALIFIKAZZJONI TA' SISTEMA TAL-ISPETTROFOTOMETRU TA' HPLC/UPLC GĦALL-KEJL TAL-FORMAŻAN MTT ESTRATT MIT-TESSUTI TAL-RHE

Parametru	Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (36) (37)	Kriterji ta' Aċċettazzjoni
Selettività	Analiżi tal-isopropanol, inbjank ħaj (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE ħajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn tessuti tal-RhE maqtula mingħajr ebda trattament)	$Area_{interference}$ ≤ 20 % ta' $Area_{LLOQ}$ [1]
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità (jiġifieri formażan MTT f'1,6 μg/ml, 16 μg/ml u 160 μg/ml) fl-isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Effett tal-Matriċi	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=5)	85 % ≤ Effett tal-Matriċi % ≤ 115 %
Riport	Analiżi tal-isopropanol wara ULOQ [2] standard	$Area_{interference}$ ≤ 20 % tal-$Area_{LLOQ}$
Riproduċibbiltà (dakinhar)	Tliet kurvi ta' kalibrazzjoni indipendenti (fuq il-bażi ta' sitt dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekuttivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jiġifieri 200 μg/ml); Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	Kurvi ta' Kalibrazzjoni: %Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Riproduċibbiltà (bejn ġranet differenti)	Jum 1:: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 2:: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 3:: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)	Kontrolli tal-Kwalità: %Dev ≤ 15 % u CV ≤ 15 %
Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' ħżin f'temperatura ambjentali	%Dev ≤ 15 %
Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhE, jekk meħtieġa	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' ħżin f'temperatura speċifikata (eż. 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev ≤ 15 %

[1] LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jiġifieri 0,8 μg/ml.
[2] ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi, jiġifieri 200 μg/ml. ”

(8) Fil-Parti B, jiżdiedu l-Kapitoli li ġejjin:

"B.63 **TEST TA' SKRINJAR TAT-TOSSIĊITÀ RIPRODUTTIVA/TAL-IŻVILUPP**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 421 tal-OECD (2016). Il-linji gwida tal-OECD għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-linja gwida tat-test ta' skrinjar oriġinali 421 ġiet adottata fl-1995, fuq il-bażi ta' protokoll għal "Test ta' Skrinjar għat-Tossiċità Riproduttiva Preliminari" diskuss f'żewġ laqgħat ta' esperti, f'Londra fl-1990 (1) u f'Tokyo fl-1992 (2).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar ġie aġġornat b'punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali, bħala segwitu għall-attività ta' prijorità għolja mnedija fl-OECD fl-1998 biex jiġu riveduti l-linji gwida tat-test eżistenti u jiġu żviluppati linji gwida tat-test ġodda għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (3). Pereżempju, it-TG 407 tal-OECD (Studju dwar it-Tossiċità Orali fuq 28 Jum b'Doża Ripetuta fir-Rodituri, Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness) ġiet miżjuda fl-2008 b'parametri xierqa biex tiġi individwata l-attività endokrinali tas-sustanzi kimiċi tat-test. L-objettiv fl-aġġornar tat-TG 421 kien li jiġu inklużi xi punti ta' tmiem rilevanti ta' interferenti endokrinali fit-TGs tal-iskrinjar meta l-perjodi ta' esponiment ikopru wħud mill-perjodi sensittivi matul l-iżvilupp (perjodi ta' qabel it-twelid jew ta' kmieni wara t-twelid).

3. Il-punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali addizzjonali magħżula, li wkoll huma parti mit-TG 443 (Studju Estiż dwar it-Tossiċità Riproduttiva f'Ġenerazzjoni Waħda, Kapitolu B.56 ta' dan l-Anness), kienu inklużi fit-TG 421 fuq il-bażi ta' studju tal-fattibbiltà li jindirizza mistoqsijiet xjentifiċi u tekniċi relatati mal-inklużjoni tagħhom, kif ukoll adattamenti possibbli fid-disinn tat-test meħtieġa għall-inklużjoni tagħhom (4).

4. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jiġġenera informazzjoni limitata rigward l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq il-prestazzjoni riproduttiva fl-irġiel u fin-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u l-ħlas. Mhuwiex alternattiva għall-metodi ta' ttestjar eżistenti B.31, B.34, B.35 jew B.56 u lanqas ma jieħdilhom posthom.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

5. Dan il-metodu ta' ttestjar ta' skrinjar jista' jintuża biex jipprovdi informazzjoni inizjali dwar l-effetti possibbli fuq ir-riproduzzjoni u/jew l-iżvilupp, jew fi stadju bikri ta' valutazzjoni tal-proprjetajiet tossikoloġiċi tas-sustanzi kimiċi, jew fuq is-sustanzi kimiċi ta' tħassib. Jista' jintuża wkoll bħala parti minn sett ta' testijiet ta' skrinjar inizjali għal sustanzi kimiċi tat-test eistenti li għalihom ftit li xejn ikun hemm informazzjoni tossikoloġika disponibbli jew l-ebda affattu, bħal studju ta' individwazzjoni tad-doża għal studji aktar estensivi dwar ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp, jew meta jitqies rilevanti b'xi mod ieħor. Fit-twettiq tal-istudju, għandhom jiġu segwiti l-prinċipji ta' gwida u l-kunsiderazzjonijiet spjegati fid-dokument ta' gwida nru 19 tal-OECD dwar ir-rikonoxximent, il-valutazzjoni, u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem umanitarji għal annimali sperimentali użati fl-evalwazzjonijiet tas-sikurezza (5).

6. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni kompluta fuq l-aspetti kollha tar-riproduzzjoni u tal-iżvilupp. B'mod partikolari, dan joffri biss mezz limitat kif jiġu individwati l-manifestazzjonijiet ta' wara t-twelid ta' esponiment ta' qabel it-twelid, jew l-effetti li jistgħu jiġu indotti matul l-esponiment ta' wara t-twelid. Minħabba (fost raġunijiet oħra) in-numri relattivament żgħar ta' annimali fil-gruppi tad-doża, is-selettività tal-punti ta' tmiem, u d-durata qasira tal-istudju, dan il-metodu mhux se jipprovdi evidenza għal dikjarazzjonijiet definiti ta' ebda effett. Barra minn hekk, fin-nuqqas ta' *data* minn testijiet oħra dwar it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali.

7. Ir-riżultati miksubin mill-parametri relatati mas-sistema endokrinali għandhom jitqiesu fil-kuntest tal-"OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals" (6). F'dan il-Qafas Kunċettwali, it-TG 421 imtejba tal-OECD tinsab fil-livell 4 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti. Madankollu, sinjal endokrinali waħdu jaf ma jitqiesx evidenza suffiċjenti li s-sustanza kimika tat-test hi interferent endokrinali.

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jassumi amministrazzjoni orali tas-sustanza kimika tat-test. Jaf ikun hemm bżonn ta' modifiki jekk jintużaw rotot oħra ta' esponiment.

9.
Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

10. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Is-sustanza kimika tat-test tingħata f'doži gradwali lil diversi gruppi ta' rġiel u nisa. L-irġiel għandhom jingħataw doża għal minimu ta' erba' ġimgħat u sal-jum ta' qabel il-qatla skedata (dan jinkludi minimu ta' ġimagħtejn qabel it-tgħammir, matul il-perjodu ta' tgħammir u, bejn wieħed u ieħor, ġimagħtejn wara t-tgħammir). Fid-dawl tal-perjodu ta' dożaġġ limitat ta' qabel it-tgħammir, il-fertilità jaf ma tkunx indikatur partikolarment sensittiv ta' tossiċità testikolari. Għaldaqstant, eżami istoloġiku dettaljat tat-testikoli hu essenzjali. Il-kombinazzjoni tal-perjodu ta' dożaġġ ta' qabel it-tgħammir ta' ġimagħtejn u l-osservazzjonijiet sussegwenti dwar it-tgħammir/il-fertilità b'perjodu ta' dożaġġ ġenerali ta' tal-anqas erba' ġimgħat, segwiti minn istopatoloġija dettaljata tal-gonadi tal-irġiel, hija meqjusa suffiċjenti biex tkun tista' tiġi individwata l-maġġoranza tal-effetti fuq il-fertilità u l-ispermatoġenesi tal-irġiel.

12. In-nisa għandhom jingħataw doża matul l-istudju kollu. Dan jinkludi ġimagħtejn qabel it-tgħammir (bl-objettiv li jkunu koperti tal-anqas żewġ ċikli estrużi sħaħ), il-ħin varjabbli sal-konċepiment, id-durata tat-tqala u tal-anqas 13-il jum wara l-ħlas, sa u inkluż il-jum ta' qabel il-qatla skedata.

13. Id-durata tal-istudju, wara l-akklimatizzazzjoni u l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż ta' qabel id-dożaġġ, tiddependi mill-prestazzjoni tan-nisa u hi madwar 63 jum, [tal-anqas 14-il jum qabel it-tgħammir, (sa) 14-il jum tat-tgħammir, 22 jum tal-ġestazzjoni, 13-il jum tat-treddigħ].

14. Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib, kull jum għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul il-perjodu tat-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

15. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jintuża b'firien. Għandha tingħata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar ikunu investigati fi speċijiet oħra ta' rodituri. Fil-programm internazzjonali ta' validazzjoni għad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali fit-TG 407 tal-OECD (li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness), il-far kien l-unika speċi użata. Ma għandhomx jintużaw razez b'fekundità baxxa jew li huma magħrufa li għandhom inċidenza għolja ta' difetti fl-iżvilupp. Għandhom ikunu użati annimali verġni f'saħħithom li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skont l-ispeċi, ir-razza, is-sess, il-piż u/jew l-età. Malli jinbeda l-istudju l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati għandha tkun minima u ma għandhiex taqbeż l-20 % tal-piż medju taż-żewġ sessi. Meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju fit-tul jew ta' ġenerazzjoni sħiħa, idealment fiż-żewġ studji jintużaw annimali li jkunu mill-istess razza u sors.

Abitazzjoni u għalf

16. Il-proċeduri kollha għandhom ikunu konformi ma' standards lokali tal-kura tal-annmali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun tal-anqas ta' 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, billi l-fotoperjodu jkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata b'dan il-metodu.

17. L-annimali għandhom jitqiegħdu f'abitazzjoni fi gruppi żgħar tal-istess sess; l-annimali jistgħu jitqiegħdu f'abitazzjoni waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat. Għal gruppi f'gaġeġ, ma għandux ikun hemm aktar minn ħames annimali jabitaw f'gaġġa waħda. Il-proċeduri ta' tgħammir għandhom jitwettqu f'gaġeġ adattati għall-iskop. In-nisa tqal għandhom jitqiegħdu fil-gaġeġ waħedhom u jiġu pprovduti b'materjali tat-tibjit. In-nisa li jkunu qed ireddgħu jitqiegħdu f'gaġeġ waħedhom mal-wild tagħhom.

18. L-għalf għandu jkun analizzat regolarment għall-kontaminanti. Għandu jinżamm kampjun tad-dieta sakemm ikun iffinalizzat ir-rapport.

Preparazzjoni tal-annimali

19. L-annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u ta' trattament. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati unikament u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom tal-anqas għal ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

Preparazzjoni tad-doża

20. Hu rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tingħata b'mod orali sakemm rotot oħra ta' amministazzjoni ma jitqisux aktar xierqa. Meta tingħażel ir-rotta orali, is-sustanza kimika tat-test normalment tingħata b'gavage; madankollu, f'każijiet oħra, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb.

21. Meta jkun hemm bżonn, is-sustanza kimika tat-test tinħall jew tiġi sospiża f'veikolu xieraq. Hu rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, segwit minn konsiderazzjoni ta' soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'veikoli oħra. Għal veikoli li mhumiex ilma, għandhom ikunu magħrufin il-karatteristiċi tossiċi tal-veikolu. Għandhom jiġu ddeterminati l-istabbiltà u l-omoġenità tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu.

PROĊEDURA

Numru u Sess tal-annimali

22. Hu rakkomandat li kull grupp jinbeda b'tal-anqas 10 irġiel u 12-13-il mara. In-nisa jiġu evalwati qabel l-esponiment għaċ-ċikliċità estruża u l-annimali li ma jurux ċikli tipiċi ta' bejn erba' u ħamest ijiem ma jiddaħħlux fl-istudju; għaldaqstant, huma rakkomandati nisa żejda biex jinkisbu 10 nisa għal kull grupp. Ħlief fil-każ ta' effetti tossiċi ċari, hu mistenni li dan jipprovdi tal-anqas tmien nisa tqal għal kull grupp li normalment ikun in-numru minimu aċċettabbli ta' nisa tqal għal kull grupp. L-objettiv hu li jiġu prodotti biżżejjed nisa tqal u wlied biex tkun żgurata evalwazzjoni sinifikattiva tal-potenzjal tas-sustanza kimika tat-test biex taffettwa l-fertilità, it-tqala, l-imġiba materna u tat-treddigħ, u t-tkabbir u l-iżvilupp tal-ulied F_1, mill-konċepiment sa 13-il jum wara l-ħlas.

Dożaġġ

23. Ġeneralment tal-anqas għandhom jintużaw tliet gruppi għat-test u grupp ta' kontroll. Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq informazzjoni minn testijiet tat-tossiċità akuta jew fuq riżultati minn studji dwar doża ripetuta. Ħlief għat-trattament bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu għall-amministrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat.

24. Il-livelli tad-doża għandhom jintgħażlu b'kunsiderazzjoni ta' kwalunkwe *data* eżistenti disponibbli dwar it-tossiċità u l-kinetika (jew it-tossikokinetika). Ta' min iqis ukoll li jista' jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u annimali mhux tqal. L-ogħla livell ta' doża għandu jintgħażel bl-għan li jġib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija severa. Wara, għandha tingħażel sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża bl-għan li jintwerew kwalunkwe reazzjoni relatata mad-dożaġġ u l-livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) fl-anqas livell tad-doża. Intervalli ta' darbtejn jew ta' erba' darbiet ta' spiss ikunu l-aħjar biex ikunu stabbiliti l-livelli neżlin tad-dożi, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test sikwit spiss tkun preferibbli milli jintużaw intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

25. Meta jkun hemm tossiċità ġenerali osservata (eż. piż tal-ġisem imnaqqas, effetti tal-fwied, qalb, pulmun jew kliewi, eċċ.) jew tibdiliet oħra li jistgħu ma jkunux risponsi tossiċi (eż. konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensittivi endokrinali għandhom ikunu interpretati b'kawtela.

Test tal-limitu

26. Jekk studju orali b'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum jew, għall-amministrazzjoni tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, ta' perċentwali ekwivalenti fid-dieta jew ta' ilma tax-xorb, billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi osservabbli u jekk ma tkunx mistennija tossiċità bbażata fuq *data* minn sustanzi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju sħiħ bl-użu ta' diversi livelli ta' doża jista' ma jitqiesx li jkun meħtieġ. It-test tal-limitu hu applikabbli apparti minn meta l-esposizzjoni umana tindika il-ħtieġa għal doża orali għola fil-livell użat. Għal tipi oħrajn ta' amministrazzjoni, bħal ma hi l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, bħal kemm tinħall, ta' spiss jistgħu jiddettaw il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb.

Amministrazzjoni tad-doża

27. L-annimali jingħataw doża tas-sustanza kimika tat-test darba kuljum għal sebat ijiem fil-ġimgħa. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata b'gavage, dan għandu jsir b'doża singola lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Ħlief għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

28. Għas-sustanzi kimiċi tat-test mogħtija permezz tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza kimika tat-test involuti ma jxekklux in-nutrizzjoni jew il-bilanċ tal-ilma normali. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal sustanza amministrata b'gavage, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili ta' kull jum, u tiġi aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa biex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal.

Skeda sperimentali

29. Id-dożaġġ taż-żewġ sessi għandu jibda tal-anqas ġimagħtejn (2) qabel it-tgħammir, wara li jkunu tħallew iderru għal tal-anqas ħamest ijiem u n-nisa jkunu ġew skrinjati għaċ-ċikli estruż normali (f'perjodu ta' pretrattament ta' ġimagħtejn). L-istudju għandu jkun skedat b'tali mod li l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż tibda ftit wara li l-annimali jkunu kisbu maturità sesswali sħiħa. Dan jista' jvarja ftit għal razez differenti ta' firien f'laboratorji differenti, eż. firien Sprague Dawley ta' 10 ġimgħat, firien Wistar li jkollhom madwar 12-il ġimgħa. L-ommijiet b'wild għandhom jinqatlu fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara. Il-jum tat-twellid (meta jitlesta l-ħlas) hu definit bħala l-jum 0 wara l-ħlas. In-nisa li ma juru ebda evidenza ta' tgħammir jinqatlu 24-26 jum wara l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir. Id-dożaġġ jissokta għaż-żewġ sessi matul il-perjodu ta' tgħammir. L-irġiel għandhom jibqgħu jingħataw id-doża wara l-perjodu ta' tgħammir tal-anqas sakemm jitlesta l-perjodu minimu totali ta' dożaġġ ta' 28 jum. Imbagħad dawn jinqatlu jew inkella jinżammu u jibqgħu jingħataw id-doża għat-twettiq possibbli tat-tieni fażi ta' tgħammir jekk jitqies li din tkun xierqa.

30. Id-dożaġġ ta' kuljum tan-nisa ommijiet għandu jkompli matul it-tqala u tal-anqas sal-jum 13 wara l-ħlas, b'dan il-jum inkluż, jew sal-jum ta' qabel is-sagrifiċċju. Għall-istudji li fihom is-sustanza kimika tat-test tingħata bit-teħid man-nifs jew bir-rotta dermali, id-dożaġġ għandu jkompli tal-anqas sal-jum 19 tal-ġestazzjoni, b'dan il-jum inkluż, u d-dożaġġ għandu jerġa' jinbeda mill-aktar fis possibbli u mhux aktar tard mill-PND 4.

31. Dijagramma tal-iskeda sperimentali hi mogħtija fl-Appendiċi 2.

Priċedura tat-tgħammir

32. Normalment, f'dan l-istudju għandu jsir tgħammir 1:1 (raġel wieħed ma' mara waħda). Jista' jkun hemm eċċezzjonijiet f'każ ta' mwiet okkażjonali tal-irġiel. Il-mara għandha titqiegħed mal-istess raġel sakemm tiġi osservata evidenza ta' tgħammir jew ikunu għaddew ġimagħtejn. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tapp vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala hu definit bħala l-jum li fih tiġi kkonfermata evidenza ta' tgħammir (jinstabu tapp vaġinali jew sperma). Fil-każ li l-par ma jirnexxix, jista' jiġi kkunsidrat it-tgħammir mill-ġdid ta' nisa ma' rġiel diġa ipprovati tal-istess grupp.

Daqs tal-boton

33. Fil-jum 4 wara t-twelid, id-daqs ta' kull boton jista' jiġi aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda b'għażla aleatorja biex jitrendew, l-aktar viċin possibbli, erba' jew ħamest ifrieħ għal kull sess għal kull boton skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użata. Il-kampjuni tad-demm għandhom jingħabru minn tnejn mill-frieħ eċċessi, jiġu raggruppati, u jintużaw għad-determinazzjoni tal-livelli tas-serum T4. Ma għandhiex issir eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż. fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem, jew tad-distanza anoġenitali (AGD). Mull meta n-numru ta' frieħ irġiel jew nisa jipprevjeni milli jkun hemm erbgħa jew ħamsa minn kull sess għal kull boton, hu aċċettabbli li jsir aġġustament parzjali (pereżempju, sitt irġiel u erba' nisa). Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas mill-mira tal-qtil (8 jew 10 ferħ/boton). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mill-mira tal-qtil, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

34. Jekk id-daqs tal-boton ma jkunx aġġustat, żewġt ifrieħ għal kull boton jiġu sagrifikati fil-jum 4 wara t-twelid u jittieħdu l-kampjuni tad-demm għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal-ormon tat-tirojde tas-serum. Jekk possibbli, iż-żewġt ifrieħ għal kull boton għandhom ikunu frieħ nisa biex il-frieħ irġiel jinżammu għall-evalwazzjonijiet taż-żamma tal-beżżula ħlief fil-każ li jekk jitneħħew dawn il-frieħ ma jifdal ebda nisa għall-valutazzjoni fit-terminazzjoni. Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas minn 8 jew 10 ifrieħ/boton (skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użati). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mid-daqs normali tal-boton, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

Osservazzjonijiet fil-ħajja

Osservazzjonijiet kliniċi

35. Matul il-perjodu tat-test, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali tal-anqas darba kuljum, u aktar spiss meta jiġu osservati sinjali ta' tossiċità. Idealment dawn għandhom isiru fl-istess ħin kuljum, b'kunsiderazzjoni tal-perjodu bl-ogħla livell ta' effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Tibdil relevanti fl-imġiba, sinjali ta' diffikultà jew titwil tal-proċess tal-ħlas u kull sinjal ta' tossiċità, inkluża l-mortalità, għandhom ikunu irreġistrati. Dawn ir-rekords għandhom jinkludu l-ħin tal-bidu, il-grad u d-durata tas-sinjali ta' tossiċità.

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel/ilma

36. L-irġiel u n-nisa għandhom jintiżnu fl-ewwel jum tad-dożaġġ, tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, u fit-terminazzjoni. Matul it-tqala, in-nisa għandhom jintiżnu fil-jiem 0, 7, 14 u 20 u fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom ikunu rapportati individwalment għal kull annimal adult.

37. Matul il-fażi ta' qabel it-tgħammir, it-tqala u t-treddigħ, il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel tal-anqas darba fil-ġimgħa. Il-kejl tal-konsum tal-ikel matul it-tgħammir hu fakultattiv. Il-konsum tal-ikel matul dawn il-perjodi għandu jitkejjel ukoll meta s-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb.

Ċikli estruż

38. Iċ-ċikli estruż għandhom jiġu ssorveljati qabel ma jibda t-trattament biex għall-istudju jintgħażlu nisa b'ċikliċità regolari (ara l-paragrafu 22). It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu ssorveljati ta' kuljum ukoll mill-bidu tal-perjodu ta' trattament sal-evidenza ta' tgħammir. Jekk ikun hemm tħassib dwar effetti akuti ta' stress li jistgħu jbiddlu ċ-ċikli estruż bit-tnedija tad-dożaġġ, il-laboratorji jistgħu jesponu l-annimali tat-test għal ġimaghtejn (2), imbagħad jiġbru tiċpisiet vaġinali ta' kuljum biex jissorveljaw iċ-ċiklu estruż għal minimu ta' ġimaghtejn matul il-perjodu ta' qabel it-tgħammir b'monitoraġġ issoktat fil-perjodu ta' tgħammir sakemm ikun hemm evidenza ta' tgħammir. Meta jinkisbu ċelloli vaġinali/ċervikali, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tfixkil tal-mukoża, li jista' jinduċi psewdotqala (7) (8).

Parametri tal-ulied

39. Id-durata tal-ġestazzjoni għandha tiġi reġistrata u hi kkalkolata mill-jum 0 tat-tqala. Kull boton għandu jiġi eżaminat mill-aktar fis possibbli wara l-ħlas biex jiġu stabbiliti n-numru u s-sess tal-frieħ, it-twelid mejjet, it-twelid ħaj, it-twelid mhux żviluppat (frieħ li jkunu ferm iżgħar mill-frieħ tal-kontroll korrispondenti) u l-preżenza ta' anormalitajiet serji.

40. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jitqassmu skont is-sess u kull boton għandu jintiżen fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Minbarra l-osservazzjonijiet deskritti fil-paragrafu 35, kwalunkwe mġiba anormali tal-wild għandha tiġi reġistrata.

41. L-AGD ta' kull ferħ għandha titkejjel fl-istess jum postnatali bejn il-PND 0 sal-PND 4. Il-piż tal-ġisem tal-frieħ għandu jinġabar dakinhar li titkejjel l-AGD u l-AGD għandha tiġi normalizzata għal kejl tad-daqs tal-ferħ, idealment l-għerq kwadrat tal-piż tal-ġisem (9). In-numru ta' bżieżel/areoli fil-frieħ irġiel għandu jingħadd fil-PND 12 jew 13 kif rakkomandat fil-GD 151 tal-OECD (10).

Bijokimika klinika

42. Il-kampjuni tad-demm minn sit definit jittieħdu fuq il-bażi tal-iskeda li ġejja:

— minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fil-jum 4 wara t-twelid, jekk in-numru ta' frieħ jippermetti (ara l-paragrafi 33-34)

— mill-ommijiet kollha u minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fit-terminazzjoni fil-jum 13, u

— mill-irġiel adulti kollha, fit-terminazzjoni,

Il-kampjuni kollha tad-demm jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Kampjuni tad-demm mill-frieħ tal-jum 13 u mill-irġiel adulti jiġu vvalutati għal-livelli tas-serum għall-ormoni tat-tirojde (T4). Issir valutazzjoni ulterjuri tat-T4 fil-kampjuni tad-demm għall-ommijiet u għall-frieħ tal-jum 4 jekk tkun rilevanti. Hemm l-għażla li jistgħu jitkejlu ormoni oħra jekk ikunu rilevanti. Id-demm tal-frieħ jista' jiġi raggruppat skont il-boton għall-analiżijiet tal-ormon tat-tirojde. L-ormoni tat-tirojde (T4 u TSH) idealment għandhom jitkejlu bħala "total".

43. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-konċentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:

— il-ħin tal-qatla minħabba varjazzjonijiet tul il-jum tal-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— il-metodu tal-qatla biex tkun evitata tensjoni bla bżonn għall-annimali li tista' taffettwa l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— is-settijiet tat-testijiet għad-determinazzjonijiet tal-ormoni li jistgħu jkunu differenti mill-kurvi standard tagħhom.

44. Kampjuni ta' plażma maħsubin speċifikatament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f'ħin komparabbli tal-jum. Il-valuri numeriċi miksubin meta jkunu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta' analiżi kummerċjali.

Patoloġija

Nekroskopija grossa

45. Fil-waqt tas-sagrifiċċju jew tal-mewt matul l-istudju, l-annimali adulti għandhom jiġu eżaminati makroskopikament għal kwalunkwe anormalità jew tibdil patoloġiku. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-organi tas-sistema riproduttiva. In-numru ta' siti ta' impjantazzjoni għandu jiġi reġistrat. It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu eżaminati filgħodu dakinhar tan-nekroskopija biex jiġi determinat l-istadju taċ-ċiklu estruż u tkun tista' ssir korrelazzjoni mal-istopatoloġija tal-ovarji.

46. It-testikoli u l-epididimidi kif ukoll il-bżieżaq tal-prostata u seminali bil-glandoli koagolanti fis-sħuħija tagħhom, tal-annimali adulti rġiel kollha għandhom jiġu mirquma minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u l-piż niedi tagħhom għandu jittieħed mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. Barra minn hekk, il-piżijiet tal-organi fakultattivi jistgħu jinkludu l-kumpless tal-levator ani u tal-muskolu bulbokavernuż, il-glandoli ta' Cowper u r-ras tal-pene fl-irġiel u l-ovarji f'pari (piż imxarrab) u l-utru (inkluż iċ-ċerviċi) fin-nisa; jekk inklużi, dawn il-piżijiet għandhom jinġabru mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni.

47. Frieħ mejtin u frieħ maqtula fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara, tal-anqas għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa esternament għal anormalitajiet serji. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-ġenitali riproduttivi esterni li għandhom jiġu eżaminati għal sinjali ta' żvilupp mibdul. Fil-jum 13, għandha tiġi preservata t-tirojde minn ferħ raġel wieħed u minn ferħ mara waħda għal kull boton.

48. L-ovarji, it-testikoli, l-organi sesswali aċċessorji (utru u ċerviċi, epididimidu, prostata, bużżieqa seminali u l-glandoli koagolanti), it-tirojde u l-organi kollha li juru leżjonijiet makroskopiċi tal-annimali adulti kollha għandhom jiġu preservati. Il-fissazzjoni formalina mhix rakkomandata għall-eżaminazzjoni ta' rutina tat-testikoli u tal-epididimidu. Metodu aċċettabbli hu l-użu tal-fissattiv ta' Bouin jew ta' Davidsons modifikat għal dawn it-tessuti (11). It-tunika albuġinea tista' tittaqqab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b'labra biex jitħalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv.

Istopatoloġija

49. Għandu jsir eżami istoloġiku dettaljat fuq l-ovarji, it-testikoli u l-epididimide (b'enfasi speċjali fuq l-istadji tal-ispermatoġenesi u l-istopatoloġija tal-istruttura ċellolari testikolari interstizjali) tal-annimali tal-grupp tal-ogħla doża u tal-grupp tal-kontroll. L-organi preservati l-oħra inkluża t-tirojde mill-frieħ u mill-annimali adulti jistgħu jiġu eżaminati meta jkun hemm bżonn. Il-piż tat-tirojde jista' jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirqim għandu jsir ukol b'reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-ħsara lit-tessut. Il-ħsara fit-tessut tista' tippreġudika analiżi istopatoloġika. L-eżaminazzjonijiet għandhom ikunu estiżi għall-annimali tal-gruppi l-oħra ta' dożaġġ meta jkunu osservati tibdiliet fil-grupp tal-ogħla doża. Il-Gwida dwar l-istopatoloġija (11) tagħti aktar informazzjoni dwar id-dissezzjoni, fissazzjoni, tqassim f'taqsimiet u l-istopatoloġija ta' tessuti endokrinali.

DATA U RAPPORTAR

Data

50. Għandha tkun ipprovduta d-*data* dwar l-annimali individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tingħabar f'forma tabulari, u għal kull grupp tat-test għandha turi n-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew qtil uman, in-numru ta' annimali fertili, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inklużi l-ħin tal-ewwel darba, id-durata, u s-severità ta' kwalunkwe effett tossiku, it-tip ta' tibdiliet istopatoloġiċi u d-*data* rilevanti kollha dwar il-boton. Format tabulari tar-rapport ta' sommarju li wera li hu tassew siewi għall-evalwazzjoni tal-effett riproduttiv/tal-iżvilupp hu mogħti fl-Appendiċi 3.

51. Minħabba d-dimensjonijiet limitati tal-istudju, l-analiżijiet statistiċi fil-forma ta' testijiet għal "sinifikat" huma ta' valur limitat għal ħafna punti ta' tmiem, speċjalment il-punti ta' tmiem riproduttivi. Jekk jintużaw analiżijiet statistiċi, il-metodu magħżul għandu jkun xieraq għad-distribuzzjoni tal-varjabbli eżaminat, u jintgħażel qabel il-bidu tal-istudju. Analiżi statistika tal-AGD u taż-żamma tal-beżżula għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tal-effetti fuq il-boton. Fejn xieraq, il-boton hu l-unità ta' analiżi. Analiżi statistika tal-piż tal-ġisem tal-frieħ għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tad-daqs tal-boton. Minħabba d-daqs żgħir tal-grupp, l-użu ta' *data* storika tal-kontroll (eż. għad-daqs tal-boton), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.

Evalwazzjoni tar-riżultati

52. Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossiċità għandhom jiġu evalwati f'termini tal-effetti osservati, tan-nekroskopija u tas-sejbiet mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni bejn id-doża u s-sustanza kimika tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità tal-annormalitajiet, inklużi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, l-infertilità, l-anormalitajiet kliniċi, l-imġiba tar-riproduzzjoni u l-boton affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħra.

53. Minħabba l-perjodu qasir ta' trattament tal-irġiel, l-istopatoloġija tat-testikoli u tal-epididimu għandha tiġi kkunsidrata flimkien mad-*data* dwar il-fertilità meta jiġu vvalutati l-effetti riproduttivi fuq l-irġiel. L-użu ta' *data* storika tal-kontroll fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp (eż. għad-daqs tal-boton, l-AGD, iż-żamma tal-beżżula, il-livelli tas-serum T4), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.

54. Għall-kontroll tal-kwalità hu propost li tingħabar *data* storika ta' kontroll u li għad-*data* numerika jkunu kkalkolati l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni, speċjalment għall-parametri li jkollhom rabta mad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali. Din id-*data* tista' tintuża għal finijiet ta' paragun meta jkunu evalwati studji attwali.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Veikolu (jekk xieraq):

— ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu jekk mhuwiex ilma.

L-annimali tat-test:

— speċi/razza użata;

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

— ġustifikazzjoni għal speċi jekk ma jkunx far

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/il-preparazzjoni tad-dieta, il-konċentrazzjonijiet, l-istabbiltà u l-omoġenità miksubin tal-preparazzjoni;

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— konverżjoni minn dieta/konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura ta' każwalizzazzjoni biex jintgħażlu l-frieħ għall-qtil, jekk jinqatlu.

Ir-riżultati:

— il-piż tal-ġisem/it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem;

— il-konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk disponibbli;

— id-*data* dwar ir-rispons tossiku skont is-sess u d-doża, inklużi l-fertilità, il-ġestazzjoni u kwalunkwe sinjal ieħor ta' tossiċità;

— it-tul tal-ġestazzjoni;

— l-effetti tossiċi jew oħra fuq ir-riproduzzjoni, l-ulied, it-tkabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;

— in-natura, is-severità u d-durata tal-osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);

— in-numru ta' nisa adulti b'ċiklu estruż normali jew anormali u d-durata taċ-ċiklu;

— in-numru ta' twelid ħaj u ta' telf ta' wara l-impjantazzjoni;

— id-*data* dwar il-piż tal-ġisem tal-frieħ

— l-AGD tal-frieħ kollha (u l-piż tal-ġisem fl-jum tal-kejl tal-AGD)

— iż-żamma tal-beżżula fil-frieħ irġiel,

— il-livelli tal-ormon tat-tirojde, il-frieħ tal-jum 13 u l-irġiel adulti (u l-ommijiet u l-frieħ tal-jum 4 jekk jitkejlu)

— in-numru ta' frieħ b'anormalitajiet viżibbli ċari, evalwazzjoni grossa tal-ġenitali esterni, in-numru ta' frieħ imwielda żgħar;

— il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqgħu ħajjin fit-terminazzjoni tat-test;

— in-numru ta' impjantazzjonijiet, id-daqs tal-boton u l-piżijiet tal-boton fil-ħin tar-reġistrazzjoni;

— il-piż tal-ġisem fis-sagrifiċċju u d-*data* dwar il-piż tal-organi għall-annimali ġenituri;

— sejbiet tan-nekroskopija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi;

— id-dettalji tal-assorbiment (jekk disponibbli);

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn xieraq.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

Interpretazzjoni tar-riżultati

56. L-istudju jipprovdi evalwazzjonijiet tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp assoċjata mal-amministrazzjoni ta' doži ripetuti (ara l-paragrafi 5 u 6). Jista' jipprovdi indikazzjoni tal-ħtieġa li jsiru investigazzjonijiet ulterjuri u jipprovdi gwida fit-tfassil tal-istudji sussegwenti. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 għandu jiġi kkonsultat għal għajnuna fl-interpetazzjoni tar-riżultati dwar ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp (12). Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 106 dwar l-Evalwazzjoni Istoloġika tat-Testijiet Endokrinali u Riproduttivi fir-Rodituri (11) jipprovdi informazzjoni dwar it-tħejjija u l-evalwazzjoni tal-organi (endokrinali) u tat-tiċpisiet vaġinali li jistgħu jkunu ta' għajnuna għal din it-TG.

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (1990). Dokument tas-seduta Nru 1 għall-14-il Laqgħa Konġunta tal-Chemicals Group and Management Committee. Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) OECD (1992). Ir-Rapport tal-President tal-Laqgħa ta' Esperti *ad hoc* dwar il-Metodi ta' Skrinjar tat-Tossiċità Riproduttiva, Tokyo, 27-29 ta' Ottubru, 1992. Disponibbli Fuq Talba Mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(3) OECD (1998). Rapport tal-Ewwel Laqgħa tat-Task Force tal-OECD dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (EDTA), 10-11 ta' Marzu 1998. Disponibbli Fuq Talba Mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. u Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Parti B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, f'Auston C.R. u Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. u Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET (ARA WKOLL IL-GD 150 TAL-OECD (6))

Androġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T3) f'organiżmu mammiferu.

Sustanza kimika hi sustanza jew taħlita.

Tossiċità tal-iżvilupp: il-manifestazzjoni tat-tossiċità riproduttiva, li tirrappreżenta disturbi strutturali jew funzjonali prenatali, perinatali u postnatali fil-wild.

Dożaġġ hi terminu ġenerali li jinvolvi d-doża, il-frekwenza tagħha u d-durata tad-dożaġġ.

Doża hi l-ammont ta' sustanza kimika tat-test mogħtija. Id-doża hi espressa bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità ta' piż tal-ġisem ta' annimal tat-test għal kull jum (eż. mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jew bħala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Tossiċità evidenti hi terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun ġiet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu u għandhom ikunu tali li żieda fid-doża amministrata tista' tkun mistennija li tirriżulta fl-iżvilupp ta' sinjali ta' tossiċità estrema u probabbilment mortalità.

Indeboliment tal-fertilità tirrappreżenta disturbi tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel jew tan-nisa.

Tossiċità materna: effetti avversi fuq nisa tqal, li jseħħu b'mod speċifiku (effett dirett) jew mhux speċifiku (effett indirett).

NOAEL hi l-abbrevjazzjoni għal-livell bla effett ħażin osservat. Dan hu l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet ħżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minħabba trattament.

Estroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Tossiċità riproduttiva tirrappreżenta l-effetti dannużi fuq il-wild u/jew indeboliment tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel u tan-nisa.

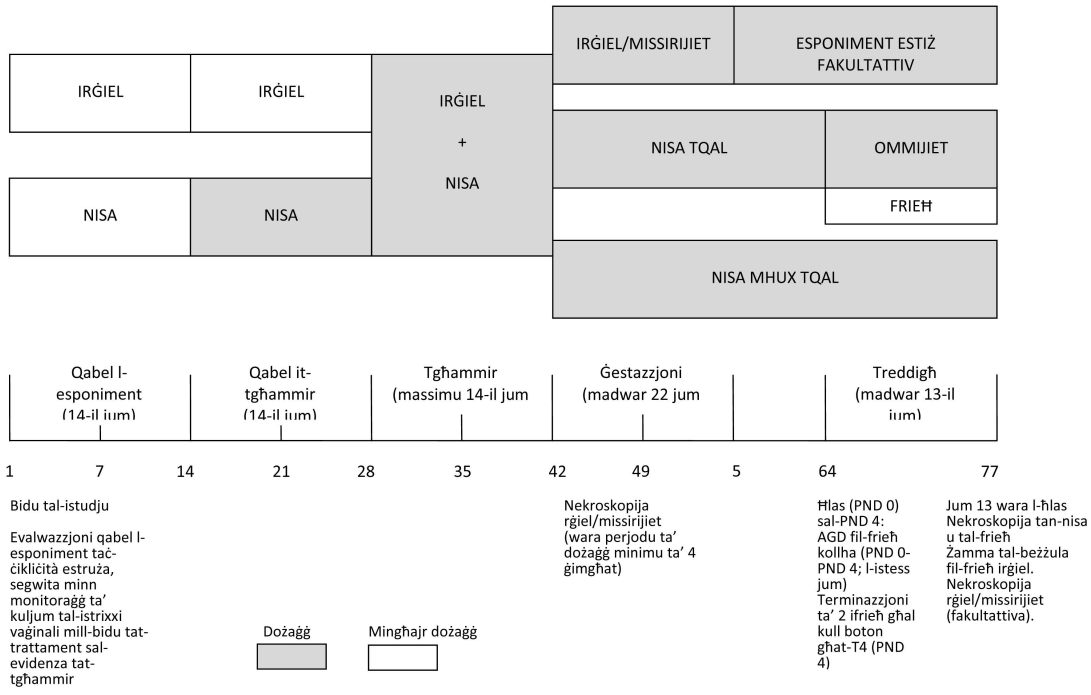
Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Attività tat-tirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon naturali tat-tirojde (eż. $T_{3)}$ f'organiżmu mammiferu.

Validazzjoni hi proċess xjentifiku mfassal biex jiġu karatterizzati r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex tintwera l-affidabbiltà u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

Appendiċi 2

DIJAGRAMMA TAL-ISKEDA SPERIMENTALI LI TINDIKA D-DURATA MASSIMA TAL-ISTUDJU, FUQ IL-BAŻI TA' PERJODU SĦIĦ TA' TGĦAMMIR FUQ 14-IL JUM



Appendiċi 3

RAPPORT SOMMARJU TABULARI TAL-EFFETTI FUQ IR-RIPRODUZZJONI/L-IŻVILUPP

OSSERVAZZJONIJIET	Valuri				
Dożaġġ (unitajiet)	0 (kontroll)	—	—	—	—
Pari mibdija (N)					
Ċiklu estruż (tal-anqas it-tul medju u l-frekwenza taċ-ċikli irregolari)					
Nisa li juru evidenza ta' tgħammir (N)					
Nisa li jilħqu t-tqala (N)					
Jiem tal-konċepiment 1 - 5 (N)					
Jiem tal-konċepiment 6 -...[1] (N)					
Tqala ≤ 21 jum (N)					
Tqala = 22 jum (N)					
Tqala ≥ 23 jum (N)					
Ommijiet b'żgħar ħajjin imwielda (N)					
Ommijiet b'żgħar ħajjin imwielda fil-jum 4 pp (N)					
Impjanti/omm (medja)					
Frieħ ħajjin/omm fil-ħlas (medja)					
Frieħ ħajjin/omm fil-jum 4 (medja)					
Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-ħlas (medja)					
Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-boton fil-ħlas (medja)					
Piż tal-boton fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-frieħ fil-ħlas (medja)					
Piż tal-frieħ fil-ħin tal-kejl tal-AGD (medja tal-irġiel, medja tan-nisa)					

OSSERVAZZJONIJIET	Valuri				
Dożaġġ (unitajiet)	0 (kontroll)	—	—	—	—
AGD tal-frieħ fl-istess jum wara t-twelid, fil-ħlas – fil-jum 4 (medja tal-irġiel, medja tan-nisa, nota tal-PND)					
Piż tal-frieħ fil-jum 4 (medja)					
Żamma tal-beżżula tal-frieħ irġiel fil-jum 13 (medja)					
Piż tal-frieħ fil-jum 13 (medja)					
FRIEĦ ANORMALI					
Ommijiet b'0					
Ommijiet b'1					
Ommijiet bi ≥ 2					
TELF TAL-ULIED					
Impjantazzjonijiet qabel/wara t-twelid (impjantazzjonijiet nieqes it-twelid ħaj)					
Nisa b'0					
Nisa b'1					
Nisa bi 2					
Nisa bi ≥ 3					
Wara t-twelid (twelid ħaj nieqes il-ħajjin fil-jum 13 wara t-twelid)					
Nisa b'0					
Nisa b'1					
Nisa b'2					
Nisa bi ≥ 3					

(1) l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir

B.64 STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ B'DOŻA RIPETUTA KOMBINAT MAT- TEST TA SKRINJAR TAT-TOSSIĊITÀ RIPRODUTTIVA/TAL-IŻVILUPP

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 422 tal-OECD (2016). Il-linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi jiġu rieżaminati kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-linja gwida tat-test ta' skrinjar oriġinali 422 ġiet adottata fl-1996, fuq il-bażi ta' protokoll għal "Doża Ripetuta Kombinata u Test ta' Skrinjar Riproduttiv/tal-Iżvilupp" diskuss f'żewġ laqgħat ta' esperti, f'Londra fl-1990 (1) u f'Tokyo fl-1992 (2).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar jgħaqqad parti tal-iskrinjar tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp li hi bbażata fuq l-esperjenza miksuba fil-Pajjiżi membri mill-użu tal-metodu oriġinali fuq sustanzi kimiċi eżistenti b'volum ta' produzzjoni għoli u f'testijiet esploratorji b'sustanzi tal-kontroll pożittiv (3) (4), u parti tat-tossiċità b'doża ripetuta, b'mod konkordat mal-linja gwida tat-test 407 tal-OECD (Studju dwar it-Tossiċità Orali fuq 28 Jum b'Doża Ripetuta, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar ġie aġġornat b'punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali, bħala segwitu għall-attività ta' prijorità għolja mnedija fl-OECD fl-1998 biex jiġu riveduti l-linji gwida tat-test eżistenti u jiġu żviluppati linji gwida tat-test ġodda għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (5). F'dan il-kuntest, it-TG 407 (li jikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness) issaħħet fl-2008 b'parametri xierqa għall-individwar tal-attività endokrinali tas-sustanzi kimiċi tat-test. L-objettiv fl-aġġornar tat-TG 422 kien li jiġu inklużi xi punti ta' tmiem rilevanti ta' interferenti endokrinali fit-TGs tal-iskrinjar meta l-perjodi ta' esponiment ikopru wħud mill-perjodi sensittivi matul l-iżvilupp (perjodi ta' qabel it-twelid jew ta' kmieni wara t-twelid).

4. Il-punti ta' tmiem rilevanti tal-interferenti endokrinali addizzjonali magħżula, li wkoll huma parti mit-TG 443 (Studju Estiż dwar it-Tossiċità Riproduttiva f'Ġenerazzjoni Waħda, li jikkorrispondi għall-Kapitolu B.56 ta' dan l-Anness), kienu inklużi fit-TG 422 fuq il-bażi ta' studju tal-fattibbiltà li jindirizza mistoqsijiet xjentifiċi u tekniċi relatati mal-inklużjoni tagħhom, kif ukoll adattamenti possibbli fid-disinn tat-test meħtieġa għall-inklużjoni tagħhom (6).

5. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jiġġenera informazzjoni limitata rigward l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq il-prestazzjoni riproduttiva fl-irġiel u fin-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u l-ħlas. Mhuwiex alternattiva għall-metodi ta' ttestjar eżistenti B.31, B.34, B.35 jew B.56 u lanqas ma jiħdilhom posthom.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

6. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' sustanza kimika tat-test, id-determinazzjoni ta' tossiċità orali bl-użu ta' dożi ripetuti tista' ssir wara li tkun inkisbet l-informazzjoni inizjali dwar it-tossiċità bl-ittestjar akut. Dan l-istudju jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli possibbli għas-saħħa li aktarx li jirriżultaw minn esponiment ripetut fuq perjodu relattivament limitat ta' żmien. Il-metodu jinkludi l-istudju dwar id-doża bażika ripetuta ta' tossiċità li jista' jintuża għal kimiċi li dwarhom ma jkunx jista' jsir studju ta' 90 jum (eż. meta l-volum tal-produzzjoni ma jkunx jeċċedi ċerti limiti) jew bħala studju preliminari għal studju fit-tul. Fit-twettiq tal-istudju, għandhom jiġu segwiti l-prinċipji ta' gwida u l-kunsiderazzjonijiet spjegati fid-dokument ta' gwida nru 19 tal-OECD dwar ir-rikonoxximent, il-valutazzjoni, u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem umanitarji għal annimali sperimentali użati fl-evalwazzjonijiet tas-sikurezza (7).

7. Jinkludi wkoll test ta' skrinjar tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp u, għalhekk, jista' jintuża wkoll biex jipprovdi informazzjoni inizjali dwar l-effetti possibbli fuq il-prestazzjoni riproduttiva tal-irġiel u tan-nisa bħall-funzjoni gonadali, l-imġiba tat-tgħammir, il-konċepiment, l-iżvilupp tal-konċepit u tal-ħlas, fi stadju bikri tal-valutazzjoni tal-proprjetajiet tossikoloġiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, jew inkella fuq is-sustanzi kimiċi tat-test ta' thassib. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni kompluta fuq l-aspetti kollha tar-riproduzzjoni u tal-iżvilupp. B'mod partikolari, dan joffri biss mezz limitat kif jiġu individwati l-manifestazzjonijiet ta' wara t-twelid ta' esponiment ta' qabel it-twelid, jew l-effetti li jistgħu jiġu indotti matul l-esponiment ta' wara t-twelid. Minħabba (fost raġunijiet oħra) is-selettività tal-punti ta' tmiem, u d-durata qasira tal-istudju, dan il-metodu mhux se jipprovdi evidenza għal dikjarazzjonijiet definiti ta' ebda effett fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp. Barra minn hekk, fin-nuqqas ta' *data* minn testijiet oħra dwar it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali.

8. Ir-riżultati miksubin mill-parametri relatati mas-sistema endokrinali għandhom jitqiesu fil-kuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi Interferenti Endokrinali" (8). F'dan il-Qafas Kunċettwali, it-TG 422 imtejba tal-OECD tinsab fil-livell 4 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti. Madankollu, sinjal endokrinali waħdu jaf ma jitqiesx evidenza suffiċjenti li s-sustanza kimika tat-test hi interferent endokrinali.

9. Dan il-metodu ta' ttestjar jenfasizza wkoll fuq l-effetti newroloġiċi bħala punt ta' tmiem, u fuq il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi bil-galbu tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni. Il-metodu għandu jidentifika is-sustanzi kimiċi li għandhom potenzjal newrotossiku, u li jistgħu jiġġustifikaw investigazzjoni approfondita ulterjuri ta' dan l-aspett. Barra minn hekk, il-metodu jista' jagħti wkoll indikazzjoni bażika tal-effetti immunoloġiċi.

10. Fin-nuqqas ta' *data* minn studji oħra dwar it-tossiċità sistemika, it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, in-newrotossiċità u/jew l-immunotossiċità, ir-riżultati pożittivi huma siewja għall-valutazzjoni inizjali tal-periklu u jikkontribwixxu għal deċiżjonijiet b'rabta man-neċessità u mat-tempestività tat-testijiet addizzjonali. It-test jista' jkun partikolarment siewi bħala parti mill-Ġabra ta' *Data* għall-Analiżi (SIDS) tal-OECD għall-valutazzjoni tas-sustanzi kimiċi eżistenti li għalihom ftit li xejn ikun hemm informazzjoni tossikoloġika disponibbli jew ebda informazzjoni affattu u jista' jservi bħala alternattiva għat-twettiq ta' żewġ testijiet separati għal tossiċità b'doża ripetuta (TG 407 tal-OECD, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness) u t-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp (TG 421 tal-OECD, li tikkorrispondi għall-Kapitolu B.63 ta' dan l-Anness), rispettivament. Jista' jintuża wkoll bħala studju ta' individwazzjoni tad-doża għal studji aktar estensivi dwar ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp, jew meta jitqies rilevanti għal xi raġuni oħra.

11. Ġeneralment jiġi preżunt li jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u mhux tqal. Konsegwentement, jista' jkun aktar kumplikat li jiġu determinati livelli tad-doża f'dan it-test kombinat li jkunu adegwati biex jiġu evalwati kemm it-tossiċità sistemika ġenerali kif ukoll it-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp speċifika, minflok meta t-testijiet indiviwali jitwettqu b'mod separat. Barra minn hekk, l-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test fir-rigward tat-tossiċità sistemika ġenerali tista' tkun aktar diffiċli milli meta jitwettaq studju separat b'doża ripetuta, speċjalment meta l-parametri tas-serum u tal-istopatoloġija ma jkunux evalwati fl-istess ħin fl-istudju. Minħabba dawn il-kumplesstajiet tekniċi, hi meħtieġa esperjenza konsiderevoli fl-ittestjar tat-tossiċità għat-twettiq ta' dan it-test ta' skrinjar kombinat. Min-naħa l-oħra, apparti n-numru iżgħar ta' annimali involuti, it-test kombinat jista' joffri mezz aħjar kif jiġu disrkiminati l-effetti diretti fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp minn dawk li huma sekondarji għal effetti (sistemiċi) oħra.

12. F'dan it-test, il-perjodu ta' dożaġġ hu itwal milli fi studju konvenzjonali b'doża ripetuta fuq 28 jum. Madankollu, juża anqas annimali ta' kull sess għal kull grupp meta mqabbel mas-sitwazzjoni li fiha jitwettaq studju konvenzjonali b'doża ripetuta fuq 28 jum minbarra Test ta' Skrinjar tat-Tossiċità Riproduttiva/tal-Iżvilupp.

13. Dan il-metodu ta' ttestjar jassumi amministrazzjoni orali tas-sustanza kimika tat-test. Jaf ikun hemm bżonn ta' modifiki jekk jintużaw rotot oħra ta' esponiment.

14. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

15. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAT-TEST

16. Is-sustanza kimika tat-test tingħata f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' rġiel u nisa. L-irġiel għandhom jingħataw doża għal minimu ta' erba' ġimgħat, sal-jum ta' qabel il-qatla skedata (dan jinkludi minimu ta' ġimagħtejn qabel it-tgħammir, matul il-perjodu ta' tgħammir u, bejn wieħed u ieħor, ġimagħtejn wara t-tgħammir). Fid-dawl tal-perjodu ta' dożaġġ limitat ta' qabel it-tgħammir, il-fertilità jaf ma tkunx indikatur partikolarment sensittiv ta'

tossiċità testikolari. Għaldaqstant, eżami istoloġiku dettaljat tat-testikoli hu essenzjali. Il-kombinazzjoni tal-perjodu ta' dożaġġ ta' qabel it-tgħammir ta' ġimagħtejn u l-osservazzjonijiet sussegwenti dwar it-tgħammir/il-fertilità b'perjodu ta' dożaġġ ġenerali ta' tal-anqas erba' ġimgħat, segwiti minn istopatoloġija dettaljata tal-gonadi tal-irġiel, hija meqjusa suffiċjenti biex tkun tista' tiġi individwata l-maġġoranza tal-effetti fuq il-fertilità u l-ispermatoġenesi tal-irġiel.

17. In-nisa għandhom jingħataw doża matul l-istudju kollu. Dan jinkludi ġimagħtejn qabel it-tgħammir (bl-objettiv li jkunu koperti tal-anqas żewġ ċikli estrużi sħaħ), il-ħin varjabbli sal-konċepiment, id-durata tat-tqala u tal-anqas 13-il jum wara l-ħlas, sa u inkluż il-jum ta' qabel il-qatla skedata.

18. Id-durata tal-istudju, wara l-akklimatizzazzjoni u l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż ta' qabel id-dożaġġ, tiddependi mill-prestazzjoni tan-nisa u hi madwar 63 jum, [tal-anqas 14-il jum qabel it-tgħammir, (sa) 14-il jum tat-tgħammir, 22 jum tal-ġestazzjoni, 13-il jum tat-treddigħ].

19. Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib, kull jum għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

20. Dan il-metodu ta' ttestjar hu mfassal biex jintuża b'firien. Għandha tingħata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f'dan it-TG 422 ikunu investigati fi speċijiet oħra ta' rodituri. Fil-programm internazzjonali ta' validazzjoni għad-detezzjoni tal-interferenti endokrinali fit-TG 407, il-far kien l-unika speċi użata. Ma għandhomx jintużaw razez b'fekundità baxxa jew li huma magħrufa li għandhom inċidenza għolja ta' difetti fl-iżvilupp. Għandhom ikunu użati annimali verġni f'saħħithom li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skont l-ispeċi, ir-razza, is-sess, il-piż u/jew l-età. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati ma għandux jaqbeż ± 20 % tal-valur medju ta' kull sess. Meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju fit-tul jew ta' ġenerazzjoni sħiħa, idealment fiż-żewġ studji jintużaw annimali li jkunu mill-istess razza u sors.

Abitazzjoni u għalf

21. Il-proċeduri kollha għandhom ikunu konformi ma' standards lokali tal-kura tal-annmali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperiment għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °). L-umdità relattiva għandha tkun tal-anqas ta' 30 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, billi l-fotoperjodu jkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata taħlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata b'dan il-metodu.

22. L-annimali għandhom jitqiegħdu f'abitazzjoni fi gruppi żgħar tal-istess sess; l-annimali jistgħu jitqiegħdu f'abitazzjoni waħedhom jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat. Għal gruppi f'gaġeġ, ma għandux ikun hemm aktar minn ħames annimali jabitaw f'gaġġa waħda. Il-proċeduri ta' tgħammir għandhom jitwettqu f'gaġeġ adattati għall-iskop. In-nisa tqal għandhom jitqiegħdu fil-gaġeġ waħedhom u jiġu pprovduti b'materjali tat-tibjit. In-nisa li jkunu qed ireddgħu jitqiegħdu f'gaġeġ waħedhom mal-wild tagħhom.

23. L-għalf għandu jkun analizzat regolarment għall-kontaminanti. Għandu jinżamm kampjun tad-dieta sakemm ikun iffinalizzat ir-rapport.

Preparazzjoni tal-annimali

24. Annimali adulti żgħażagħ b'saħħithom huma miġbura kif jinzerta u assenjati għall-gruppi tat-trattament u għall-gaġeġ. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati unikament u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom tal-anqas għal ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

Preparazzjoni tad-doży

25. Hu rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tingħata b'mod orali sakemm rotot oħra ta' amministazzjoni ma jitqisux aktar xierqa. Meta tingħażel ir-rotta orali, is-sustanza kimika tat-test normalment tingħata b'gavage; madankollu, f'każijiet oħra, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw ukoll mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb.

26. Meta jkun hemm bżonn, is-sustanza kimika tat-test tinħall jew tiġi sospiża f'veikolu xieraq. Hu rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel għandu jitqies l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni fl-ilma, segwit minn konsiderazzjoni ta' soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'veikoli oħra. Għal veikoli mhux milwiema, għandhom ikunu magħrufin il-karatteristiċi tossiċi tal-veikolu. Għandhom jiġu ddeterminati l-istabbiltà u l-omoġenità tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu.

PROĊEDURA

Numru u Sess tal-annimali

27. Hu rakkomandat li kull grupp jinbeda b'tal-anqas 10 irġiel u 12-13-il mara. In-nisa jiġu evalwati qabel l-esponiment għaċ-ċikliċità estruża u l-annimali li ma jurux ċikli tipiċi ta' bejn erba' u ħamest ijiem ma jiddaħħlux fl-istudju; għaldaqstant, huma rakkomandati nisa żejda biex jinkisbu 10 nisa għal kull grupp. Ħlief fil-każ ta' effetti tossiċi ċari, hu mistenni li dan jipprovdi tal-anqas tmien nisa tqal għal kull grupp li normalment ikun in-numru minimu aċċettabbli ta' nisa tqal għal kull grupp. L-objettiv hu li jiġu prodotti biżżejjed nisa tqal u wlied biex tkun żgurata evalwazzjoni sinifikattiva tal-potenzjal tas-sustanza kimika tat-test biex taffettwa l-fertilità, it-tqala, l-imġiba materna u tat-treddigħ, u t-tkabbir u l-iżvilupp tal-ulied F_1, mill-konċepiment sa 13-il jum wara l-ħlas. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali ppjanati li jinqatlu qabel tmiem l-istudju. Għandha tingħata konsiderazzjoni għal grupp satellitarju addizzjonali ta' ħames annimali għal kull sess fil-grupp ta' kontroll u f'dak tad-doża l-aktar għolja għall-osservazzjoni ta' riversibbiltà, persistenza jew okkorrenza mdewma ta' effetti tossiċi sistemiċi, għal mill-anqas 14-il jum wara it-trattament. L-annimali tal-gruppi satellitarji ma jitgħammrux u, konsegwentement, ma jintużawx għall-valutazzjoni tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp.

Dożaġġ

28. Ġeneralment, tal-anqas għandhom jintużaw tliet gruppi għat-test u grupp ta' kontroll. Jekk ma jkun hemm l-ebda *data* adattata disponibbli dwar it-tossiċità ġenerali, jista' jsir studju dwar tiftix ta' firxa (annimali tal-istess razza u sors) bħala għajnuna għad-determinazzjoni tad-doża li jkollhom jintużaw. Ħlief għat-trattament bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu biex tkun amministrata s-sustanza kimika tat-test, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat.

29. Il-livelli tad-doża għandhom jintgħażlu b'kunsiderazzjoni ta' kwalunkwe *data* eżistenti disponibbli dwar it-tossiċità u l-kinetika (jew it-tossikokinetika). Ta' min iqis ukoll li jista' jkun hemm differenzi fis-sensittività bejn annimali tqal u annimali mhux tqal. L-ogħla livell ta' doża għandu jintgħażel bl-għan li jġib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija evidenti. Wara, għandha tingħażel sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża bl-għan li jintwerew kwalunkwe reazzjoni relatata mad-dożaġġ u ebda effett avvers fl-anqas livell tad-doża. Intervalli ta' darbtejn jew ta' erba' darbiet ta' spiss ikunu ottimali u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test sikwit spiss tkun preferibbli milli jintużaw intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

30. Meta jkun hemm tossiċità ġenerali osservata (eż. piż tal-ġisem imnaqqas, effetti tal-fwied, qalb, pulmun jew kliewi, eċċ.) jew tibdiliet oħra li jistgħu ma jkunux risponsi tossiċi (eż. konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensittivi endokrinali għandhom ikunu interpretati b'kawtela.

Test tal-limitu

31. Jekk studju orali b'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum jew, għall-amministrazzjoni tad-dieta, ta' perċentwali ekwivalenti fid-dieta, jew ta' ilma tax-xorb (fuq il-bażi tad-determinazzjonijiet tal-piż tal-ġisem), billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi osservabbli u jekk ma tkunx mistennija tossiċità bbażata fuq *data* minn sustanzi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju sħiħ bl-użu ta' diversi livelli ta' doża jista' ma jitqiesx li jkun meħtieġ. It-test ta' limitu japplika ħlief meta espożizzjoni umana tindika l-ħtieġa li jkollu jintuża livell ogħla ta' doża. Għal tipi oħrajn ta' amministrazzjoni, bħal ma hi l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test, bħal kemm tinħall, ta' spiss jistgħu jiddettaw l-esponiment massimu li jista' jinkiseb.

Amministrazzjoni tad-doża

32. L-annimali jingħataw doża tas-sustanza kimika tat-test darba kuljum għal sebat ijiem f'ġimgħa. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata b'gavage, dan għandu jsir b'doża singola lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Ħlief għal sustanzi kimiċi tat-test

irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

33. Għal sustanzi kimiċi tat-test mogħtija permezz tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza kimika tat-test involuti ma jxekklux in-nutrizzjoni jew il-bilanċ tal-ilma normali. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun amministrata fid-dieta, konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal, jista' jkun użat; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal sustanza amministrata b'gavage, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili ta' kull jum, u tiġi aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa biex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal. Meta l-istudju kombinat jintuża bħala preliminari għal studju tat-tossiċità riproduttiva fit-tul jew sħiħ, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

Skeda sperimentali

34. Id-dożaġġ taż-żewġ sessi għandu jibda ġimagħtejn (2) qabel it-tgħammir, wara li jkunu tħallew iderru għal tal-anqas ħamest ijiem u n-nisa jkunu ġew skrinjati għaċ-ċikli estruż normali (f'perjodu ta' pretrattament ta' ġimagħtejn). L-istudju għandu jkun skedat b'tali mod li l-evalwazzjoni taċ-ċiklu estruż tibda ftit wara li l-annimali jkunu kisbu maturità sesswali sħiħa. Dan jista' jvarja ftit għal razez differenti ta' firien f'laboratorji differenti, eż. firien Sprague Dawley ta' 10 ġimgħat, firien Wistar li jkollhom madwar 12-il ġimgħa. L-ommijiet b'wild għandhom jinqatlu fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara. Biex l-ommijiet jitħallew isumu qabel il-ġbir tad-demm (jekk din l-għażla tkun preferuta), l-ommijiet u uliedhom mhux bilfors ikollhom jinqatlu fl-istess jum. Il-jum tat-twellid (meta jitlesta l-ħlas) hu definit bħala l-jum 0 wara l-ħlas. In-nisa li ma juru ebda evidenza ta' tgħammir jinqatlu 24-26 jum wara l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir. Id-dożaġġ jissokta għaż-żewġ sessi matul il-perjodu ta' tgħammir. L-irġiel għandhom jibqgħu jingħataw id-doża wara l-perjodu ta' tgħammir tal-anqas sakemm jitlesta l-perjodu minimu totali ta' dożaġġ ta' 28 jum. Imbagħad dawn jinqatlu jew inkella jinżammu u jibqgħu jingħataw id-doża għat-twettiq possibbli tat-tieni faži ta' tgħammir jekk jitqies li din tkun xierqa.

35. Id-dożaġġ ta' kuljum tan-nisa ommijiet għandu jkompli matul it-tqala u tal-anqas sal-jum 13 wara l-ħlas, b'dan il-jum inkluż, jew sal-jum ta' qabel is-sagrifiċċju. Għall-istudji li fihom is-sustanza kimika tat-test tingħata bit-teħid man-nifs jew bir-rotta dermali, id-dożaġġ għandu jkompli tal-anqas sal-jum 19 tal-ġestazzjoni, b'dan il-jum inkluż, u d-dożaġġ għandu jerġa' jinbeda mill-aktar fis possibbli u mhux aktar tard mill-jum 4 ta' wara t-twelid (PND).

36. L-annimali fi grupp satellitarju skedati għall-osservazzjonijiet ta' segwitu, jekk jiġu inklużi, ma jitħallewx jitgħammru. Dawn għandhom jinżammu tal-anqas għal 14-il jum ulterjuri wara l-ewwel qtil skedat tal-ommijiet, mingħajr trattament biex jiġu individwati okkorrenza ttardjata, jew persistenza ta' effetti tossiċi jew irkupru minn dawn.

37. Dijagramma tal-iskeda sperimentali hi mogħtija fl-Appendiċi 2.

Ċikli estruż

38. Iċ-ċikli estruż għandhom jiġu ssorveljati qabel ma jibda t-trattament biex għall-istudju jintgħażlu nisa b'ċikliċità regolari (ara l-paragrafu 27). It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu ssorveljati ta' kuljum ukoll mill-bidu tal-perjodu ta' trattament sal-evidenza ta' tgħammir. Jekk ikun hemm tħassib dwar effetti akuti ta' stress li jistgħu jbiddlu ċ-ċikli estruż bit-tnedija tad-dożaġġ, il-laboratorji jistgħu jesponu l-annimali tat-test għal ġimagħtejn (2), imbagħad jiġbru tiċpisiet vaġinali ta' kuljum biex jissorveljaw iċ-ċiklu estruż għal minimu ta' ġimagħtejn matul il-perjodu ta' qabel it-tgħammir b'monitoraġġ issoktat fil-perjodu ta' tgħammir sakemm ikun hemm evidenza ta' tgħammir. Meta jinkisbu ċelloli vaġinali/ċervikali, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tfixkil tal-mukoża, li jista' jinduċi psewdotqala (8) (9).

Priċedura tat-tgħammir

39. Normalment, f'dan l-istudju għandu jsir tgħammir 1:1 (raġel wieħed ma' mara waħda). Jista' jkun hemm eċċezzjonijiet f'każ ta' mwiet okkażjonali tal-irġiel. Il-mara għandha titqiegħed mal-istess raġel sakemm tiġi osservata evidenza ta' tgħammir jew ikunu għaddew ġimagħtejn. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tapp vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala hu definit bħala l-jum li fih tiġi kkonfermata evidenza ta' tgħammir (jinstabu tapp vaġinali jew sperma). Fil-każ li l-par ma jkunx irnexxa, jista' jiġi kkunsidrat it-tgħammir mill-ġdid ta' nisa ma' rġiel diġa ipprovati tal-istess grupp.

Daqs tal-boton

40. Fil-jum 4 wara t-twelid, id-daqs ta' kull boton jista' jiġi aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda b'għażla aleatorja biex jitrendew, l-aktar viċin possibbli, erba' jew ħamest ifrieħ għal kull sess għal kull boton skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użata. Il-kampjuni tad-demm għandhom jingħabru minn tnejn mill-frieħ eċċessivi, jiġu raggruppati, u jintużaw għad-determinazzjoni tal-livelli tas-serum T4. Ma għandhiex issir eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż. fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem jew tad-distanza anoġenitali (AGD). Mull meta n-numru ta' frieħ irġiel jew nisa jipprevjeni milli jkun hemm erbgħa jew ħamsa minn kull sess għal kull boton, hu aċċettabbli li jsir aġġustament parzjali (pereżempju, sitt irġiel u erba' nisa). Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas mill-mira tal-qtil (8 jew 10 ferħ/boton). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mill-mira tal-qtil, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

41. Jekk id-daqs tal-boton ma jkunx aġġustat, żewġt ifrieħ għal kull boton jiġu sagrifikati fil-jum 4 wara t-twelid u jittieħdu l-kampjuni tad-demm għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal-ormon tat-tirojde tas-serum. Jekk possibbli, iż-żewġt ifrieħ għal kull boton għandhom ikunu frieħ nisa biex il-frieħ irġiel jinżammu għall-evalwazzjonijiet taż-żamma tal-beżżula, ħlief fil-każ li jekk jitneħħew dawn il-frieħ ma jifdal ebda nisa għall-valutazzjoni fit-terminazzjoni. Ebda ferħ ma jiġi eliminat meta d-daqs tal-boton jonqos għal anqas minn 8 jew 10 ifrieħ/boton (skont id-daqs normali tal-boton fir-razza ta' firien użati). Jekk ikun hemm ferħ wieħed biss disponibbli aktar mid-daqs normali tal-boton, ferħ wieħed biss jiġi eliminat u jintuża għall-ġbir tad-demm għall-valutazzjonijiet possibbli tas-serum T4.

Osservazzjonijiet

42. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali tal-anqas darba kuljum, idealment fl-istess ħin(ijiet) kuljum u b'kunsiderazzjoni tal-perjodu bl-ogħla livell ta' effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni tas-saħħa tal-annimali għandha tiġi rreġistrata. Tal-inqas darbtejn kuljum l-annimali kollha jiġu osservati għal morbidità u għal mortalità.

43. Darba qabel l-ewwel esponiment (biex ikunu jistgħu jsiru paraguni fi ħdan l-istess suġġetti), u tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi dettaljati fl-annimali ġenituri kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa f'arena standard u preferebbilment fl-istess jum kull darba. Dawn għandhom jiġu reġistrati bir-reqqa; idealment bl-użu ta' sistemi ta' punteġġ, definiti b'mod espliċitu mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandu jsir sforz biex ikun żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test ikunu minimi u li l-osservazzjonijiet preferibbilment jitmexxew minn osservaturi li ma jkunux jafu bit-trattament. Is-sinjali osservati għandhom jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, tibdliet fil-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż., dmugħ, piloerezzjoni, daqs tal-ħabba, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Tibdliet fil-mixja, fil-qagħda u fir-rispons għal immaniġġar, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv), ħlas bit-tbatija jew fit-tul jew imġiba biżarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (10).

44. Darba matul l-istudju, ir-reattività sensorjali għal stimoli ta' modalitajiet differenti (eż. stimoli awditorji, viżwali u proprjoċettivi) (8) (9) (11), valutazzjoni tas-saħħa tal-qabda (12) u valutazzjoni tal-attività motorja (13) għandhom isiru f'ħamest irġiel u f'ħames nisa, magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp. Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi. Fl-irġiel, dawn l-osservazzjonijiet funzjonali għandhom isiru lejn tmiem il-perjodu tad-dożaġġ, ftit qabel il-qtil skedat iżda qabel il-kampjunar tad-demm għall-ematoloġija jew għall-kimika klinika (ara l-paragrafi 53-56, inkluża n-nota 1 f'qiegħ il-paġna). In-nisa għandhom ikunu fi stat fiżjoloġikament simili matul dawn it-testijiet funzjonali u idealment għandhom jiġu ttestjati darba matul l-aħħar ġimgħa tat-treddigħ (eż. LD 6-13), ftit qabel il-qtil skedat. Sa fejn possibbli, naqqas il-ħinijiet ta' separazzjoni tal-ommijiet u tal-frieħ.

45. Osservazzjonijiet funzjonali li jsiru darba lejn tmiem l-istudju jistgħu jitħallew barra meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju subkroniku sussegwenti (90 jum) jew fit-tul. F'dak il-każ, l-osservazzjonijiet funzjonali għandhom ikunu inklużi f'dan studju ta' segwitu. Min-naħa l-oħra, id-disponibbiltà ta' *data* dwar osservazzjonijiet funzjonali minn dan l-istudju b'doża ripetuta tista' ssaħħaħ il-kapaċità biex jintgħażlu dożi għal studju subkroniku sussegwenti jew fit-tul.

46. Bħala eċċezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu wkoll jitħallew barra għal gruppi li xort'oħra juru sinjali ta' tossiċità tant li tfixkel b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.

47. Id-durata tal-ġestazzjoni għandha tiġi reġistrata u hi kkalkolata mill-jum 0 tat-tqala. Kull boton għandu jiġi eżaminat mill-aktar fis possibbli wara l-ħlas biex jiġu stabbiliti n-numru u s-sess tal-frieħ, it-twelid mejjet, it-twelid ħaj, it-twelid mhux żviluppat (frieħ li jkunu ferm iżgħar mill-frieħ tal-kontroll korrispondenti), u l-preżenza ta' anormalitajiet serji.

48. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jitqassmu skont is-sess u kull boton għandu jintiżen fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Minbarra l-osservazzjonijiet fuq l-annimali ġenituri (ara l-paragrafi 43 u 44), kwalunkwe mġiba anormali tal-wild għandha tiġi reġistrata.

49. L-AGD ta' kull ferħ għandha titkejjel fl-istess jum postnatali bejn il-PND 0 sal-PND 4. Il-piż tal-ġisem tal-frieħ għandu jingħabar dakinhar li titkejjel l-AGD u l-AGD għandha tiġi normalizzata għal kejl tad-daqs tal-ferħ, idealment l-għerq kwadrat tal-piż tal-ġisem (14). In-numru ta' bżieżel/areoli fil-frieħ irġiel għandu jingħadd fil-PND 12 jew 13 kif rakkomandat fil-GD 151 tal-OECD (15).

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel/ilma

50. L-irġiel u n-nisa għandhom jintiżnu fl-ewwel jum tad-dożaġġ, tal-anqas darba fil-ġimgħa wara dan, u fit-terminazzjoni. Matul it-tqala, in-nisa għandhom jintiżnu fil-jiem 0, 7, 14 u 20 u fi żmien 24 siegħa mill-ħlas (jum 0 jew 1 wara l-ħlas) u tal-anqas fil-jiem 4 u 13 wara l-ħlas. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom ikunu rapportati individwalment għal kull annimal adult.

51. Matul il-fażi ta' qabel it-tgħammir, it-tqala u t-treddigħ, il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel tal-anqas darba fil-ġimgħa. Il-kejl tal-konsum tal-ikel matul it-tgħammir hu fakultattiv. Il-konsum tal-ikel matul dawn il-perjodi għandu jitkejjel ukoll meta s-sustanza kimika tat-test tingħata b'dak il-medium.

Ematoloġija

52. Darba matul l-istudju, għandhom isiru l-eżaminazzjonijiet ematoloġiċi li ġejjin f'ħamest irġiel u ħames nisa magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp: ematokrit, konċentrazzjoni ta' emoglobina, l-għadd ta' eritroċiti, retikuloċiti, l-għadd totali u differenzjali tal-lewkoċiti, l-għadd tal-pjastrini u kejl tal-ħin/potenzjali ta' koagulazzjoni. Determinazzjonijiet oħra li għandhom isiru, jekk is-sustanza kimika tat-test jew il-metaboliti putattivi tagħha jkollhom jew ikunu ssuspettati li jkollhom proprjetajiet ossidanti, jinkludu konċentrazzjoni ta' metemoglobina u l-korpi ta' Heinz.

53. Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn sit imsemmi. In-nisa għandhom ikunu fi stat fiżjoloġikament simili matul il-kampjunar. Biex jiġu evitati diffikultajiet prattiċi relatati mal-varjabbiltà fil-bidu tal-ġestazzjoni, il-ġbir tad-demm fin-nisa jista' jsir fi tmiem il-perjodu ta' tgħammir bħala alternattiva għall-kampjunar eżatt qabel il-proċedura għall-ewtanażja tal-annimali jew bħala parti minn din. Il-kampjuni tad-demm tal-irġiel idealment għandhom jittieħdu eżatt qabel l-ewtanażja tal-annimali jew bħala parti minn din. Inkella, il-ġbir tad-demm fl-irġiel jista' jsir ukoll fi tmiem il-perjodu ta' tgħammir meta dan il-punt ta' żmien ikun ingħata preferenza għan-nisa.

54. Il-kampjuni tad-demm għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa.

Bijokimika klinika

55. Id-determinazzjonijiet tal-bijokimika klinika biex jiġu investigati effetti tossiċi kbar f'tessuti u, b'mod speċifiku, l-effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demm miksuba mill-ħamest irġiel u mill-ħames nisa magħżula ta' kull grupp. Hu rakkomandat is-sawm mal-lejl tal-annimali qabel it-teħid tal-kampjuni tad-demm ([18]). L-investigazzjonijiet tal-plażma jew serum għandhom jinkludu is-sodju, il-potassju, il-glokożju, il-kolesterol totali, l-urea, il-kreatinina, il-proteini u l-albumina totali, tal-anqas żewġ enzimi indikattivi ta' effetti epatoċellulari (bħalma huma l-alanina aminotransferaży, aspartataminotransferaży u sorbitol deidroġenaży) u aċidi biljari. Il-kejl ta' enzimi addizzjonali (ta' oriġini epatika jew oriġinijiet oħra) u ta' bilirubina jistgħu jipprovdu informazzjoni utli f'ċerti ċirkostanzi.

56. Il-kampjuni tad-demm minn sit definit jittieħdu fuq il-bażi tal-iskeda li ġejja:

— minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fil-jum 4 wara t-twelid, jekk in-numru ta' frieħ jippermetti (ara l-paragrafi 40-41)

— mill-ommijiet kollha u minn tal-anqas żewġt ifrieħ għal kull boton fit-terminazzjoni fil-jum 13, u

— mill-irġiel adulti kollha, fit-terminazzjoni

Il-kampjuni kollha tad-demm jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Kampjuni tad-demm mill-frieħ tal-jum 13 u mill-irġiel adulti jiġu vvalutati għal-livelli tas-serum għall-ormoni tat-tirojde (T4). Issir valutazzjoni ulterjuri tat-T4 fil-kampjuni tad-demm għall-ommijiet u għall-frieħ tal-jum 4 jekk tkun rilevanti. Hemm l-għażla li jistgħu jitkejlu ormoni oħra jekk ikunu rilevanti. Id-demm tal-frieħ jista' jiġi raggruppat skont il-boton għall-analiżijiet tal-ormon tat-tirojde. L-ormoni tat-tirojde (T4 u TSH) idealment għandhom jitkejlu bħala "total".

([18]) Għal għadd ta' kejlijiet ta' serum u plażma, l-aktar għall-glukożju, is-sawm tul il-lejl ikun ippreferut. Ir-raġuni ewlenija għal din il-preferenza hi li aktar varjabbiltà li għandha inevitabbilment tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, tittendi li taħbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċli. Madankollu, min-naħa l-oħra, is-sawm matul il-lejl jista' jinterferixxi mal-metaboliżmu ġenerali tal-annimali (tqal), itellef it-treddigħ u l-imġiba tat-treddigħ, u, b'mod partikolari fi studji dwar it-tagħlif, jista' jfixkel l-esponiment ta' kuljum għas-sustanza kimika tat-test. Jekk ikun adottat sawm tul il-lejl, id-determinazzjonijiet bijokimiċi kliniċi għandhom isiru wara li jkunu twettqu l-osservazzjonijiet funzjonali fir-raba' (4) ġimgħa tal-istudju għall-irġiel. L-ommijiet għandhom jinżammu għal jum ieħor wara li l-frieħ jitneħħew fil-PND 13, pereżempju). L-ommijiet għandhom jitħallew isumu tul il-lejl mill-jum tat-treddigħ 13-14 u d-demm terminali jintuża għall-parametri kimiċi kliniċi.

57. Hemm l-għażla li jsiru d-determinazzjonijiet tal-urinaliżi li ġejjin f'ħamest irġiel magħżula b'mod aleatorju ta' kull grupp matul l-aħħar ġimgħa tal-istudju bl-użu ta' ġbir ta' volum ta' urina bil-ħin miżmum; l-apparenza, il-volum, l-ożmolalità jew gravità speċifika, il-pH, il-proteini, il-glukożju u d-demm/iċ-ċelloli tad-demm.

58. Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar tas-serum ta' ħsara ġenerali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet oħra li għandhom jitwettqu jekk il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza kimika tat-test jistgħu, jew huma suspettati li jaffettwaw il-profili metaboliċi relatati jinkludu il-kalċju, it-trigliċeridi waqt sawm u l-glukożju waqt sawm, l-ormoni speċifiċi, il-metaemoglobina u l-kolinesterasi. Dawn jeħtieġ li jiġu eżaminati fuq bażi ta' każ b'każ.

59. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-konċentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:

— il-ħin tal-qatla minħabba varjazzjonijiet tul il-jum tal-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— il-metodu tal-qatla biex tkun evitata tensjoni bla bżonn għall-annimali li tista' taffettwa l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— is-settijiet tat-testijiet għad-determinazzjonijiet tal-ormoni li jistgħu jkunu differenti mill-kurvi standard tagħhom.

60. Kampjuni ta' plażma maħsubin speċifikatament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f'ħin komparabbli tal-jum. Il-valuri numeriċi miksubin meta jkunu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta' analiżi kummerċjali.

61. Jekk bażi ta' *data* storika ma tkunx adegwata, għandha tingħata kunsiderazzjoni lid-determinazzjoni ta' varjabbli ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel ma jibda d-dożaġġ jew preferibbilment f'sett ta' annimali mhux inklużi fil-gruppi ta' esperimenti. Għan-nisa, id-*data* trid tiġi minn annimali li jreddgħu.

PATOLOĠIJA

Nekroskopija grossa

62. L-annimali adulti kollha fl-istudju għandhom ikunu ssoġġettati għal nekroskopija profonda sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għal-organi tas-sistema riproduttiva. In-numru ta' siti ta' impjantazzjoni għandu jiġi reġistrat. It-tiċpisiet vaġinali għandhom jiġu eżaminati dakinhar tan-nekroskopija biex jiġi determinat l-istadju taċ-ċiklu estruż u tkun tista' ssir korrelazzjoni mal-istopatoloġija tal-organi riproduttivi tan-nisa.

63. It-testikoli u l-epididimidi kif ukoll il-bżieżaq tal-prostata u seminali bil-glandoli koagolanti fis-sħuħija tagħhom, tal-annimali adulti rġiel kollha għandhom jiġu mirquma minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u l-piż niedi tagħhom għandu jittieħed mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. Barra minn hekk, il-piżijiet tal-organi fakultattivi jistgħu jinkludu l-kumpless tal-levator ani u tal-muskolu bulbokavernuż, il-glandoli ta' Cowper u r-ras tal-pene fl-irġiel u l-ovarji f'pari (piż imxarrab) u l-utru (inkluż iċ-ċerviċi) fin-nisa; jekk inklużi, dawn il-piżijiet għandhom jinġabru mill-aktar fis possibbli wara d-dissezzjoni. L-ovarji, it-testikoli, l-epididimu, l-organi sesswali aċċessorji, u l-organi kollha li juru leżjonijiet makroskopiċi tal-annimali adulti kollha għandhom jiġu preservati.

64. Għall-irġiel u għan-nisa adulti kollha u għal raġel wieħed u għal mara waħda li jkunu frieħ tal-jum 13 minn kull boton, il-glandoli tat-tirojde għandhom jiġu preservati fl-aktar medium ta' fissazzjoni xierqa għall-eżami istopatoloġiku sussegwenti maħsub. Il-piż tat-tirojde jista' jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirqim għandu jsir ukol b'reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-ħsara lit-tessut. Il-ħsara fit-tessut tista' tippreġudika analiżi istopatoloġika. Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn sit imsemmi eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtanażja tal-annimali, u għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa (ara l-paragrafu 56).

65. Barra minn hekk, għal tal-anqas ħamest irġiel u nisa adulti, magħżula b'mod aleatorju minn kull grupp (minbarra dawk misjuba fi stat ta' agunija u/jew ewtanizzati qabel it-terminazzjoni tal-istudju), il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-timus, il-milsa, il-moħħ u l-qalb għandhom jitraqqmu minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq u l-piż tagħhom għandu jittieħed mill-aktar fis wara d-dissezzjoni biex jiġi evitat milli jinxfu. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni ispatoloġika maħsuba sussegwenti: il-leżjonijiet kbar kollha, il-moħħ (reġjuni rappreżentattivi li jinkludu ċ-ċerebru, iċ-ċerebellum u l-pons), is-sinsla tad-dahar, l-għajn, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inklużi l-irqajja' ta' Peyer), il-fwied, il-kliewi, l-adernali, il-milsa, il-qalb, it-timus, it-trakea u l-pulmun (preservat bl-infiħ b'fissattiv u mbagħad mgħaddas), il-gonadi (testikoli u ovarji), l-organi sesswali aċċessorji (utru u ċerviċi, epididimu, prostata, bżieżaq seminali u l-glandoli koagolanti), il-vaġina, il-borża tal-awrina, il-limfonodi (minbarra l-aktar limfonodu drenanti prossimali, għandu jittieħed limfonodu ieħor skont l-esperjenza tal-laboratorju (16)),

in-nerv periferali (xjatiku jew tibjali) idealment qrib il-muskolu, il-muskolu skeletali u l-għadma, bil-mudullun (sezzjoni jew inkella aspirat tal-mudullun immuntat ġdid). Hu rrakkomandat li t-testikoli jkunu ffissati b'immersjoni fil-fissattiv ta' Bouin jew f'dak modifikat ta' Davidson (16) (17) (18); fissazzjoni tal-formalina mhix rakkomandata għal dawn it-tessuti. It-tunika albuġinea tista' tittaqqab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b'labra biex jitħalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza kimika tat-test.

66. It-tessuti li ġejjin jistgħu jagħtu indikazzjoni siewja għall-effetti relatati mal-endokrina: Il-gonadi (ovarji u testikoli), l-organi sesswali aċċessorji (utru li jinkludi ċerviċi, epididimu, bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni, prostata dorsolaterali u ventrali), il-vaġina, il-glandola pitwitarja tal-mammiferi rġiel u l-glandola adrenali. It-tibdiliet fil-glandoli tal-mammiferi rġiel ma kinux iddokumentati b'mod suffiċjenti iżda dan il-parametru jista' jkun sensittiv ħafna għal sustanzi b'azzjoni estroġenika. L-osservazzjoni tal-organi/tat-tessuti li mhumiex elenkati fil-paragrafu 65 hi fakultattiva.

67. Frieħ mejtin u frieħ maqtula fil-jum 13 wara l-ħlas, jew ftit wara, tal-anqas għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa esternament għal anormalitajiet serji. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għall-ġenitali riproduttivi esterni li għandhom jiġu eżaminati għal sinjali ta' żvilupp mibdul.

Istopatoloġija

68. Għandha ssir istopatoloġija sħiħa fuq l-organi u t-tessuti preservati tal-annimali magħżula fil-gruppi tal-kontroll u ta' doża għolja (b'enfasi speċjali fuq l-istadji tal-ispermatoġenesi fil-gonadi tal-irġiel u l-istopatoloġija tal-istruttura taċ-ċelloli testikolari interstizjali). Il-glandola tat-tirojde mill-frieħ u mill-annimali adulti li jifdal tista' tiġi eżaminata meta jkun hemm bżonn. Dawn l-eżaminazzjonijiet għandhom ikunu estiżi għall-annimali tal-gruppi l-oħra ta' dożaġġ, jekk jiġu osservati tibdiliet relatati mat-trattament fil-grupp ta' doża għolja. Il-Gwida dwar l-istopatoloġija (10) tagħti aktar informazzjoni dwar id-dissezzjoni, il-fissazzjoni, is-sezzjonar u l-istopatoloġija ta' tessuti endokrinali.

69. Il-feriti kbar kollha għandhom jiġu eżaminati. Bħala għajnuna fl-iċċarar tal-NAOELs, l-organi fil-mira fi gruppi ta' doża oħra għandhom jiġu eżaminati, b'mod partikolari fi gruppi li jiġi ddikjarat li juru NAOEL.

70. Meta jintuża grupp satellitarju, l-istopatoloġija għandha ssir fuq tessuti u organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi ttrattati.

DATA U RAPPORTAR

Data

71. Għandha tkun ipprovduta d-*data* dwar l-annimali individwali. Barra minn hekk, id-*data* kollha għandha tingħabar f'forma tabulari, u għal kull grupp tat-test għandha turi n-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjuba mejta matul it-test jew ewtanizzati għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew ewtanażja, in-numru ta' annimali fertili, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inklużi l-ħin tal-ewwel darba, id-durata, u s-severità ta' kwalunkwe effett tossiku, it-tip ta' tibdiliet istopatoloġiċi u d-*data* rilevanti kollha dwar il-boton. Format tabulari tar-rapport ta' sommarju li wera li hu tassew siewi għall-evalwazzjoni tal-effetti riproduttivu/tal-iżvilupp hu mogħti fl-Appendiċi 3.

72. Meta jkun possibbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-paraguni tal-effett tul firxa tad-doża għandhom jevitaw l-użu ta' testijiet-t multipli. Il-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju. Analiżi statistika tal-AGD u taż-żamma tal-beżżula għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tal-effetti fuq il-boton. Fejn xieraq, il-boton hu l-unità ta' analiżi. Analiżi statistika tal-piż tal-ġisem tal-frieħ għandha tkun ibbażata fuq *data* tal-frieħ individwali, b'kunsiderazzjoni tad-daqs tal-boton. Minħabba d-dimensjonijiet limitati tal-istudju, l-analiżijiet statistiċi fil-forma ta' testijiet għal "sinifikat" huma ta' valur limitat għal ħafna punti ta' tmiem, speċjalment il-punti ta' tmiem riproduttivi. Uħud mill-aktar metodi użati ta' spiss, speċjalment testijiet parametriċi għall-kejl tat-tendenza ċentrali, mhumiex adattati. Jekk jintużaw analiżijiet statistiċi, il-metodu magħżul għandu jkun xieraq għad-distribuzzjoni tal-varjabbli eżaminat, u jintgħażel qabel il-bidu tal-istudju.

Evalwazzjoni tar-riżultati

73. Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossiċità għandhom jiġu evalwati f'termini tal-effetti osservati, tan-nekroskopija u tas-sejbiet mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni bejn id-doża u s-sustanza kimika tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità tal-annormalitajiet, inklużi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, l-infertilità, l-anormalitajiet kliniċi, l-imġiba tar-riproduzzjoni u l-boton affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħra.

74. Minħabba l-perjodu qasir ta' trattament tal-irġiel, l-istopatoloġija tat-testikoli u tal-epididimu għandha tiġi kkunsidrata flimkien mad-*data* dwar il-fertilità meta jiġu vvalutati l-effetti riproduttivi fuq l-irġiel. L-użu ta' *data* storika tal-kontroll fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp (eż. għad-daqs tal-boton, l-AGD, iż-żamma tal-beżżula, il-livelli tas-serum T4), fejn disponibbli, jista' jkun siewi wkoll bħala għajnuna għall-interpretazzjoni tal-istudju.

75. Għall-kontroll tal-kwalità huwa propost li tinġabar *data* storika ta' kontroll u li għad-*data* numerika jkunu kkalkolati l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni, speċjalment għall-parametri li jkollhom rabta mad-detezzjoni tal-interferent endokrinali. Din id-*data* tista' tintuża għal finijiet ta' paragun meta jkunu evalwati studji attwali.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Veikolu (jekk xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' veikolu, jekk ma jkunx ilma.

L-annimali tat-test:

— speċi/razza użata;

— l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.;

— il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

— ġustifikazzjoni għal speċi jekk ma jkunx far

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/il-preparazzjoni tad-dieta, il-konċentrazzjoni, l-istabbiltà u l-omoġenità miksubin tal-preparazzjoni,

— dettalji dwar l-għoti tas-sustanza kimika tat-test;

— konverżjoni minn dieta/konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura ta' każwalizzazzjoni biex jintgħażlu l-frieħ għall-qtil, jekk jinqatlu.

Riżultati:

— piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk applikabbli;

— id-*data* dwar ir-rispons tossiku skont is-sess u d-doża, inklużi l-fertilità, il-ġestazzjoni u kwalunkwe sinjal ieħor ta'

— tossiċità;

— it-tul tal-ġestazzjoni; l-effetti tossiċi jew oħra fuq ir-riproduzzjoni, l-ulied, it-tkabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;

— natura, severità u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);

— attività sensorja, qawwa tal-qabda u valutazzjonijiet tal-attività motorja;

— testijiet ematoloġiċi b'valuri bażi rilevanti;

— testijiet ta' bijokimika klinika b'valuri linja bażi rilevanti;

— in-numru ta' nisa adulti b'ċiklu estruż normali jew anormali u d-durata taċ-ċiklu;

— in-numru ta' twelid ħaj u ta' telf ta' wara l-impjantazzjoni;

— in-numru ta' frieħ b'anormalitajiet ferm viżibbli; evalwazzjoni profonda tal-ġenitali esterni, in-numru ta' frieħ li jitwieldu żgħar ħafna;

— il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqgħu ħajjin fit-terminazzjoni tat-test;

— in-numru ta' impjantazzjonijiet, id-daqs tal-boton u l-piżijiet tal-boton fil-ħin tar-reġistrazzjoni;

— id-*data* dwar il-piż tal-ġisem tal-frieħ

— l-AGD tal-frieħ kollha (u l-piż tal-ġisem fl-jum tal-kejl tal-AGD)

— iż-żamma tal-beżżula fil-frieħ irġiel,

— il-livelli tal-ormon tat-tirojde, il-frieħ tal-jum 13 u l-irġiel adulti (u l-ommijiet u l-frieħ tal-jum 4 jekk jitkejlu)

— il-piż tal-ġisem fis-sagrifiċċju u d-*data* dwar il-piż tal-organi għall-annimali ġenituri;

— sejbiet dwar in-nekroskopija,

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi;

— id-dettalji tal-assorbiment (jekk disponibbli);

— trattament ta' statistika ta' riżultati, fejn jixraq.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

Interpretazzjoni tar-Riżultati

77. L-istudju jipprovdi evalwazzjonijiet tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp assoċjata mal-amministrazzjoni ta' doži ripetuti. B'mod partikolari, peress li l-enfasi hi mixħuta kemm fuq il-punti ta' tmiem tat-tossiċità ġenerali kif ukoll tat-tossiċità riproduttiva/tal-iżvilupp, ir-riżutlati tal-istudju jippermettu li ssir distinzjoni bejn l-effetti fuq ir-riproduzzjoni/l-iżvilupp li jseħħu fin-nuqqas ta' tossiċità ġenerali u dawk li jkunu espressi biss f'livelli li jkunu tossiċi għall-annimali ġenituri wkoll (ara l-paragrafi 7-11). Jista' jipprovdi indikazzjoni tal-ħtieġa li jsiru investigazzjonijiet ulterjuri u jista' jipprovdi gwida fit-tfassil tal-istudji sussegwenti. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 għandu jiġi kkonsultat għal għajnuna fl-interpetazzjoni tar-riżultati dwar ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp (19). Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 106 dwar l-Evalwazzjoni Istoloġika tat-Testijiet Endokrinali u Riproduttivi fir-Rodituri (16) jipprovdi informazzjoni dwar it-tħejjija u l-evalwazzjoni tal-organi (endokrinali) u tat-tiċpisiet vaġinali li jistgħu jkunu ta' għajnuna għal dan il-metodu ta' ttestjar.

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (1990). Dokument tas-seduta Nru 1 għall-14-il Laqgħa Konġunta tal-Chemicals Group and Management Committee. Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(2) OECD (1992). Ir-Rapport tal-President tal-Laqgħa ta' Esperti *ad hoc* dwar il-Metodi ta' Skrinjar tat-Tossiċità Riproduttiva, Tokyo, 27-29 ta' Ottubru, 1992. Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. u Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. u Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Rapport tal-Ewwel Laqgħa tat-Task Force tal-OECD dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (EDTA), 10-11 ta' Marzu 1998, Disponibbli fuq talba mingħand l-Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.u Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Parti B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, f'Auston C.R. u Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. u Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol.* Appl. *Pharmacol.*, 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. u Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol.*, 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp u V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(16) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(17) Hess RA u Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Fi: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET (ARA WKOLL (20) GD 150 TAL-OECD)

Androġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T3) f'organiżmu mammiferu.

Sustanza kimika hija sustanza jew taħlita.

Tossiċità tal-iżvilupp il-manifestazzjoni tat-tossiċità riproduttiva, li tirrappreżenta disturbi strutturali jew funzjonali prenatali, perinatali u post natali fil-wild.

Doża hi l-ammont ta' sustanza kimika tat-test mogħtija. Id-doża hi espressa bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità ta' piż tal-ġisem ta' annimal tat-test għal kull jum (eż. mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jew bħala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Dożaġġ hi terminu ġenerali li jinvolvi d-doża, il-frekwenza tagħha u d-durata tad-dożaġġ.

Tossiċità evidenti hi terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun ġiet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu u għandhom ikunu tali li żieda fid-doża amministrata tista' tkun mistennija li tirriżulta fl-iżvilupp ta' sinjali ta' tossiċità estrema u probabbilment mortalità.

Indeboliment tal-fertilità tirrappreżenta disturbi tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel jew tan-nisa.

Tossiċità materna effetti avversi fuq nisa tqal, li jseħħu b'mod speċifiku (effett dirett) jew mhux speċifiku (effett indirett) u li jkunu relatati mal-istat ta' tqala.

NOAEL hi l-abbrevjazzjoni għal-livell bla effett ħażin osservat. Dan hu l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet ħżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minħabba trattament.

Estroġeniċità hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Tossiċità riproduttiva tirrappreżenta l-effetti dannużi fuq il-wild u/jew indeboliment tal-funzjonijiet jew tal-kapaċità riproduttivi tal-irġiel u tan-nisa.

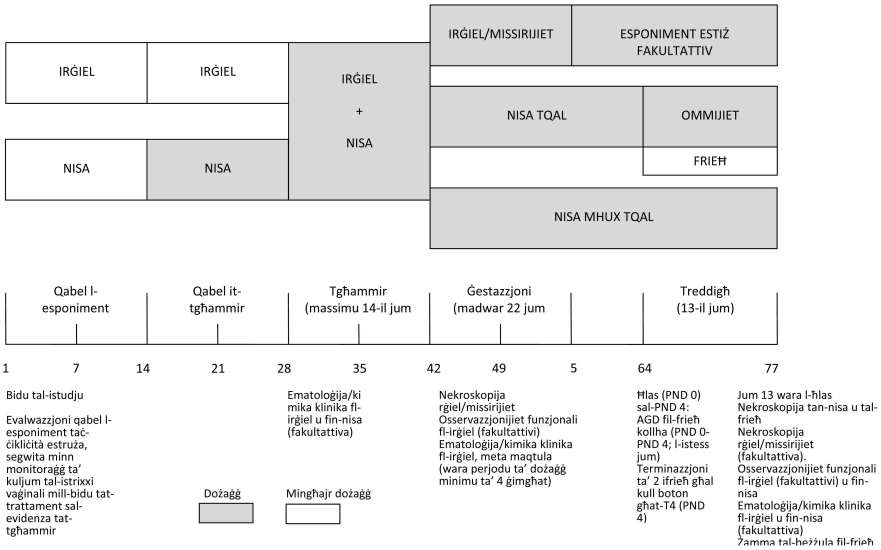
Sustanza kimika tat-test hi kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

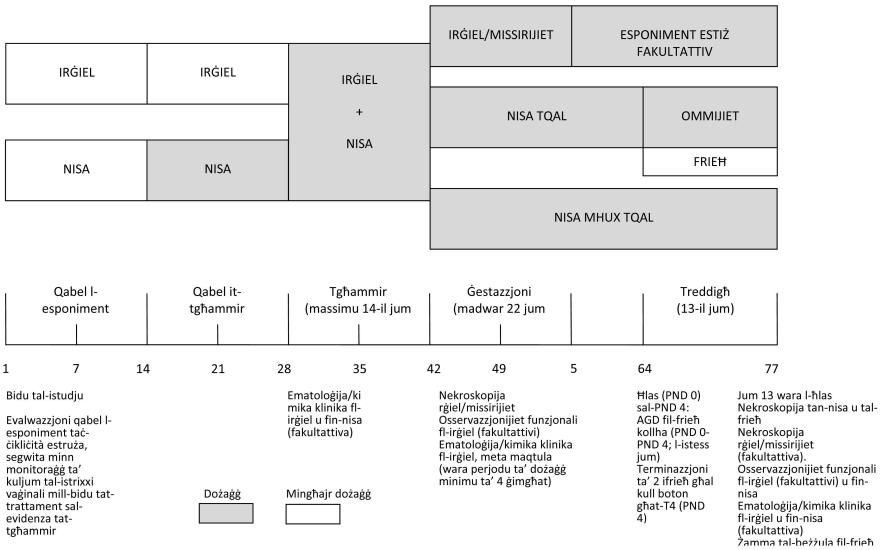
Attività tat-tirojde hi l-kapaċità ta' sustanza kimika li taġixxi bħal ormon naturali tat-tirojde (eż. T_3) f'organiżmu mammiferu.

Validazzjoni hi proċess xjentifiku mfassal biex jiġu karatterizzati r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex tintwera l-affidabbiltà u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

Appendiċi 2

DIJAGRAMMA TAL-ISKEDA SPERIMENTALI, LI TINDIKA D-DURATA MASSIMA TAL-ISTUDJU, FUQ IL-BAŻI TA' PERJODU SĦIĦ TA' TGĦAMMIR FUQ 14-IL JUM





Appendiċi 3

RAPPORT SOMMARJU TABULARI TAL-EFFETTI FUQ IR-RIPRODUZZJONI/L-IŻVILUPP

OSSERVAZZJONIJIET	Valuri				
Dożaġġ (unitajiet).....	0 (kontroll)	—	—	—	—
Pari mibdija (N)					
Ċiklu estruż (tal-anqas it-tul medju u l-frekwenza taċ-ċikli irregolari)					
Nisa li juru evidenza ta' tgħammir (N)					
Nisa li jilħqu t-tqala (N)					
Jiem tal-konċepiment 1 - 5 (N)					
Jiem tal-konċepiment 6 -...[[1]] [(1)] (N)					
Tqala≤21 jum (N)					
Tqala = 22 jum (N)					
Tqala ≥ 23 jum (N)					
Ommijiet b'żgħar ħajjin imwielda (N)					
Ommijiet b'żgħar ħajjin imwielda fil-jum 4 pp (N)					
Impjanti/omm (medja)					
Frieħ ħajjin/omm fit-twelid (medja)					
Frieħ ħajjin/omm fil-jum 4 (medja)					
Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-ħlas (medja)					
Proporzjon tas-sessi (r/n) fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-boton fil-ħlas (medja)					
Piż tal-boton fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-frieħ fil-ħlas (medja)					
Piż tal-frieħ fil-ħin tal-kejl tal-AGD (medja tal-irġiel, medja tan-nisa)					
AGD tal-frieħ fl-istess jum wara t-twelid, fil-ħlas, fil-jum 4 (medja tal-irġiel, medja tan-nisa, nota tal-PND)					

OSSERVAZZJONIJIET	Valuri				
Piż tal-frieħ fil-jum 4 (medja)					
Piż tal-frieħ fil-jum 13 (medja)					
Żamma tal-beżżula tal-frieħ irġiel fil-jum 13 (medja)					
FRIEĦ ANORMALI					
Ommijiet b'0					
Ommijiet b'1					
Ommijiet b'≥ 2					
TELF TAL-ULIED					
Impjantazzjonijiet qabel it-twelid (impjantazzjonijiet nieqes it-twelid ħaj)					
Nisa b'0					
Nisa b'1					
Nisa b'2					
Nisa b'≥ 3					
Wara t-twelid (twelid ħaj nieqes il-ħajjin fil-jum 13 wara t-twelid)					
Nisa b'0					
Nisa b'1					
Nisa b'2					
Nisa b'≥ 3					

([1]) l-aħħar jum tal-perjodu ta' tgħammir

B.65 METODU TA' TTESTJAR *IN VITRO* TAL-BARRIERA TAL-MEMBRANA GĦALL-KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 435 tal-OECD (2015). Il-korrużjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara irreversibbli għall-ġilda li tidher bħala nekrożi viżibbli permezz tal-epidermis u fid-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([19]) Dan il-metodu ta' ttestjar, ekwivalenti għal-linja gwida aġġornata 435 tal-OECD jipprovdi metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana *in vitro* li jista' jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi korrużivi. Il-metodu ta' ttestjar juża membrana artifiċjali mfassla biex twieġeb għal sustanzi kimiċi korrużivi b'mod simili għall-ġilda tal-annimali *in situ*.

2. Il-korrużività tal-ġilda tradizzjonalment ġiet ivvalutata billi tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test għall-ġilda tal-annimali ħajjin u tiġi vvalutata l-firxa tal-ħsara fit-tessut wara perjodu fiss ta' żmien (2). Minbarra dan il-metodu ta' ttestjar, ġew adottati diversi metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra bħala alternattivi (3)(4) għall-proċedura standard tal-ġilda tal-fniek *in vivo* (Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, ekwivalenti għat-TG 404 tal-OECD) użati biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi korrużivi (2). L-istrateġija ta' ttestjar u ta' evalwazzjoni mqassma fuq saffi tal-GHS tan-NU għall-valutazzjoni u għall-klassifikazzjoni tal-korrużività tal-ġilda u d-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA) għall-Irritazzjoni/Korrużjoni tal-Ġilda jirrakkomandaw l-użu ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* validati u aċċettati skont il-moduli 3 u 4 (1)(5). L-IATA jiddeskrivi diversi moduli li jiġbru fihom sorsi ta' informazzjoni u għodod ta' valutazzjoni, u (i) jipprovdi gwida dwar kif tintegra u tuża *data* eżistenti tat-testijiet u mhux tat-testijiet għall-valutazzjoni tal-potenzjali ta' irritazzjoni tal-ġilda u ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi u (ii) jipproponi approċċ fejn ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri, inkluż meta jinstabu riżultati negattivi (5). F'dan l-approċċ modulari, ir-riżultati pożittivi mill-metodi ta' ttestjar *in vitro* jistgħu jintużaw biex sustanza kimika tiġi klassifikata bħala korrużiva mingħajr il-ħtieġa ta' ttestjar fuq l-annimali, u b'hekk jitnaqqas u jiġi rfinat l-użu ta' annimali u jiġu evitati l-uġigħ u t-tbatija li jistgħu jseħħu jekk l-annimali jintużaw għal dan l-għan.

3. Tlestew studji ta' validazzjoni għall-mudell tal-barriera tal-membrana *in vitro* kummerċjalment disponibbli bħal Corrositex® (6)(7)(8), li wrew preċiżjoni ġenerali fit-tbassir tal-korrużività tal-ġilda ta' 79 % (128/163), sensittività ta' 85 % (76/89), u speċifiċità ta' 70 % (52/74) għal bażi ta' *data* ta' 163 sustanza u taħlita (7). Fuq il-bażi tal-validità rikonoxxuta tiegħu, dan il-metodu ta' riferiment validat (VRM) ġie rakkomandat biex jintuża bħala parti minn strateġija ta' ttestjar imqassma fuq saffi għall-valutazzjoni tal-potenzjal ta' periklu ta' korrużjoni dermali tas-sustanzi kimiċi (5)(7). Qabel ma mudell ta' barriera tal-membra *in vitro* għall-korrużjoni tal-ġilda jkun jista' jintuża għall-finijiet regolatorji, l-ewwel għandhom jiġu determinati l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni), u l-limitazzjonijiet tiegħu biex jiġi żgurat li jkun simili għal dak tal-VRM (9), f'konformità mal-istandards predefiniti tal-prestazzjoni (PS) (10). L-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD tiġi garantita biss wara li kwalunkwe metodu propost ġdid jew aġġornat wara l-PS ikun ġie rieżaminat u inkluż fil-linja gwida tat-test ekwivalenti tal-OECD. Bħalissa, metodu *in vitro* wieħed biss hu kopert mil-linja gwida tat-test 435 tal-OECD u dan il-metodu ta' ttestjar, il-mudell disponibbli kummerċjalment Corrositex®.

4. Metodi ta' ttestjar oħra għall-ittestjar tal-korrużività tal-ġilda huma bbażati fuq l-użu ta' ġilda umana rikostitwita (TG 431 tal-OECD) (3) u ta' ġilda ta' firien iżolati (TG 430 tal-OECD) (4). Din il-Linja Gwida tat-Test tipprovdi wkoll għas-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi korrużivi fit-tliet Subkategoriji tal-GHS tan-NU ta' korrużività u t-tliet Gruppi ta' Imballaġġ tat-Trasport tan-NU għall-periklu ta' korrużività. Din il-Linja Gwida tat-Test oriġinarjament ġiet adottata fl-2006 u aġġornata fl-2015 biex tirreferi għad-dokument ta' gwida tal-IATA u tiġi aġġornata l-lista ta' sustanzi ta' proficjenza.

DEFINIZZJONIJIET

5. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

6. It-test deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test korrużivi u jippermetti s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test korrużivi skont il-GHS tan-NU/is-CLP (Tabella 1). Barra minn hekk, metodu ta' ttestjar bħal dan jista' jintuża biex jittieħdu deċiżjonijiet dwar il-korrużività u n-nuqqas ta' korrużività ta' klassijiet speċifiċi ta' sustanzi kimiċi, *eż.* l-aċidi organiċi u inorganiċi, id-derivati tal-aċidi ([20]), u bażijiet għal ċerti finijiet ta' ttestjar tat-trasport (7)(11)(12). Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi proċedura ġenerika simili

([19]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

([20]) "Derivattiv tal-aċidu" hu dażinjazzjoni ta' klassi mhux speċifika u hu definit b'mod wiesa' bħala sustanza kimika prodotta minn aċidu b'mod dirett jew inkella b'modifika jew b'sostituzzjoni parzjali. Din il-klassi tinkludi anidridi, aċidi halo, imluħ, u tipi oħra ta' sustanzi kimiċi.

għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat (7). Filwaqt li dan il-metodu ta' ttestjar ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, ta' min jinnota li t-TM B.46 (ekwivalenti għat-TG 439 tal-OECD) jindirizza b'mod speċifiku l-irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* b'effett fuq is-saħħa (13). Għal evalwazzjoni sħiħa tal-effetti lokali fuq il-ġilda wara esponiment dermali wieħed, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Approċċi Integrati għall-Valutazzjoni tal-Ittestjar (5).

Tabella 1

Il-Kategorija u s-Subkategoriji ta' Korrużivi tal-Ġilda tal-GHS tan-NU (1) [1]

Kategorija tal-Korrużiv (kategorija 1) (għall-awtoritajiet li ma jużawx is-subkategoriji)	Subkategoriji Potenzjali tal-Korrużiv [1] (għall-awtoritajiet li jużaw is-subkategoriji, inkluż ir-Regolament CLP)	Korrużiv f'≥ annimal (1) minn 3	
		Esponiment	Osservazzjoni
Korrużiv	Subkategorija 1A tal-korrużivi	≤ 3 minuti	≤ Sieġħa (1)
	Subkategorija 1B tal-korrużivi	> 3 minuti / ≤ sieġħa (1)	≤ 14-il jum
	Subkategorija 1C tal-korrużivi	> sieġħa (1) / ≤ 4 sigħat	≤ 14-il jum

[1] Għall-UE, ir-Regolament tas-CLP japplika t-tliet subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-korrużjoni tal-ġilda.

7. Limitazzjoni tal-metodu ta' riferiment validat (7) hi li ħafna sustanzi kimiċi mhux korrużivi u xi sustanzi kimiċi korrużivi jaf ma jikkwalifikawx għall-ittestjar, fuq il-bażi tar-riżultati tat-test tal-kompatibbiltà inizjali (ara l-paragrafu 13). Sustanzi kimiċi milwiema b'pH fil-medda ta' 4,5 sa 8,5 spiss ma jikkwalifikawx għall-ittestjar; madankollu, 85 % tas-sustanzi kimiċi ttestjati f'din il-medda ta' pH ma kinux korrużivi fit-testijiet fuq l-annimali (7). Il-metodu tal-barriera tal-membrana *in vitro* jista' jintuża biex jiġu ttestjati is-solidi (solubbli jew insolubbli fl-ilma), il-likwidi (milwiema jew mhux milwiema), u l-emulsjonijiet. Madankollu, is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jikkawżawx tibdil individwabbli fit-test tal-kompatibbiltà (jiġifieri tibdil fil-kulur fis-Sistema ta' Detezzjoni tas-Sustanzi Kimiċi (CDS) tal-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat) ma jistgħux jiġu ttestjati bil-metodu tal-barriera tal-membrana u għandhhom jiġu ttestjati bl-użu ta' metodi ta' ttestjar oħra.

PRINĊIPJU TAT-TEST

8. Is-sistema tat-test tinkludi żewġ komponenti: bijobarriera makromolekolari sintetika u sistema ta' identifikazzjoni tas-sustanza kimika (CDS); dan il-metodu ta' ttestjar jindividwa permezz tal-barriera tal-membrana tas-CDS il-ħsara kkawżata ms-sustanzi kimiċi tat-test korrużivi wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje tal-barriera tal-membrana makromolekolari sintetika (7), probabbilment bl-istess mekkaniżmu/i ta' korrużjoni li jopera(w) fuq il-ġilda ħajja.

9. Il-penetrazzjoni tal-barriera tal-membrana (jew l-infid) tista' titkejjel b'numru ta' proċeduri jew b'CSD, inkluż tibdil fil-kulur ta' kulur tal-indikatur tal-pH jew f'xi proprjetà oħra tas-soluzzjoni indikatur taħt il-barriera.

10. Il-barriera tal-membrana għandha tkun determinata bħala valida, jiġifieri rilevanti u affidabbli, għall-użu maħsub tagħha. Dan jinkludi l-żgurar li l-preparati differenti jkunu konsistenti fir-rigward tal-proprjetajiet tal-barriera, *eż.* kapaċi jżommu barriera għal sustanzi mhux korrużivi, kapaċi jikkategorizzaw il-proprjetajiet korrużivi tas-sustanzi kimiċi fost id-diversi Subkategoriji ta' korrużività tal-GHS tan-NU (1). Il-klassifikazzjoni assenjata hi bbażata fuq iż-żmien meħud biex sustanza kimika tippenetra minn ġol-barriera tal-membrana sas-soluzzjoni indikatur.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

11. Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu tal-barriera tal-membrana *in vitro*, li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost tnax-il Sustanza ta' Profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' riferiment adegwata *in vivo* u *in vitro* (eż. mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (10)) dment li ma jiġux applikati l-istess kriterji tal-għażla bħal dawk deskritti fit-Tabella 1.

Tabella 2

Sustanzi ta' Proficjenza [1]

Sustanza [2]	CASRN	Klassi Kimika	Subkategorija *In Vivo* tal-GHS tan-NU [3]	Subkategorija *In Vitro* tal-GHS tan-NU [3]
Diidrat tat-trifluworur tal-Boron	13319-75-0	Aċidi inorganiċi	1A	1A
Aċidu nitriku	7697-37-2	Aċidi inorganiċi	1A	1A
Pentaklorur tal-fosfru	10026-13-8	Prekursuri tal-aċidi inorganiċi	1A	1A
Klorur tal-valeril	638-29-9	Kloruri tal-aċidu	1B)	1B)
Idrossidu tas-Sodju	1310-73-2	Bażijiet inorganiċi	1B)	1B)
1-(2-Aminoetil) piperażina	140-31-8	Ammini alifatiċi	1B)	1B)
Klorur tal-benżensulfonil	98-09-9	Kloruri tal-aċidu	1C	1C
N,N-Dimetil benżilammina	103-83-3	Anilini	1C	1C
Tetraetilenpentammina	112-57-2	Ammini alifatiċi	1C	1C
Eugenol	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Nonil akrilat	2664-55-3	Akrilati/metakrilati	NC	NC
Bikarbonat tas-sodju	144-55-8	Imluħ inorganiċi	NC	NC

(1) It-12-il sustanza elenkati hawn fuq fihom tliet sustanzi minn kull waħda mit-tliet subkategoriji tal-GHS tan-NU għal sustanzi korrużivi u tliet sustanzi mhux korrużivi, huma disponibbli minnufih minghand fornituri kummerċjali, u s-subkategorija tal-GHS tan-NU hi bbażata fuq ir-riżultati ta' ttestjar *in vivo* ta' kwalità għolja. Dawn is-sustanzi huma meħuda mil-lista ta' 40 sustanza ta' riferiment li huma inklużi fil-lista minima ta' sustanzi kimiċi identifikati għall-wiri tal-preċiżjoni u tal-affidabbiltà tal-metodi ta' ttestjar li huma strutturalment u funzjonalment simili għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat, u ntgħażlu mill-163 sustanza kimika ta' riferiment li oriġinarjament intużaw biex jiġi vvalidat il-metodu ta' ttestjar ta' riferiment (Corrositex®) (7) (10) (14). L-għan ta' dan il-proċess tal-għażla kien li jinkludi, sa fejn possibbli, sustanzi kimiċi li: kienu rappreżentattivi tal-firxa ta' risponsi tal-korrużività (eż. nonkorrużivi; Korrużivi tal-Gruppi tal-Imballaġġ I, II, u III tan-NU) li l-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat kapaċi jkejjel jew ibassar; kienu rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati matul il-proċess ta' validazzjoni; għandhom strutturi kimiċi li kienu definiti sew; indukew riżultati riproducibbli fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat; indukew riżultati definittivi fit-test ta' riferiment *in vivo*; kienu kummerċjalment disponibbli; u ma kinux assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi (14).

(2) Sustanzi ttestjati puri jew b'purità ta' ≥ 90 %

(3) Il-gruppi ta' Imballaġġ korrispondenti tan-NU huma I, II u III, rispettivament, għas-Subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU. NC; Mhux korrużivi.

PROĊEDURA

12. Il-paragrafi li ġejjin jiddeskrivu l-komponenti u l-proċeduri ta' metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana artifiċjali għall-valutazzjoni tal-korrużività (7)(15), fuq il-bażi tal-VRM kurrenti, jiġifieri l-Corrositex® kummerċjalment disponibbli. Il-barriera tal-membrana u l-kompatibbiltà/l-indikatur u s-soluzzjonijiet ta' kategorizzazzjoni jistgħu jinbnew, jitħejjew jew jinkisbu kummerċjalment bħal fil-każ tal-VRM Corrositex®. Hu disponibbli protokoll kampjun tal-metodu ta' ttestjar għall-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat (7). L-ittestjar għandu jsir f'temperatura ambjentali (17-25 °C) u l-komponenti għandhom jikkonformaw mal-kundizzjonijiet li ġejjin.

Test tal-Kompatibbiltà tas-Sustanza Kimika tat-Test

13. Qabel it-twettiq tat-test tal-barriera tal-membrana, isir test tal-kompatibbiltà biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix individwabbli mis-CDS. Jekk is-CDS ma tindividwax is-sustanza kimika tat-test, il-metodu ta' ttestjar tal-barriera tal-membrana ma jkunx xieraq għall-evalwazzjoni tal-korrużività potenzjali ta' dik is-sustanza kimika tat-test partikolari u għandu jintuża metodu ta' ttestjar differenti. Is-CDS u l-kundizzjonijiet ta' esponiment użati għat-test tal-kompatibbiltà għandhom jirriflettu l-esponiment fit-test tal-barriera tal-membrana sussegwenti.

Test tal-Kategorija tal-Iskala ta' Żmien tas-Sustanza Kimika tat-Test

14. Jekk dan ikun xieraq għall-metodu ta' ttestjar, sustanza kimika tat-test li tkun ġiet kwalifikata mit-test tal-kompatibbiltà għandha tkun soġġetta għal test tal-kategorija tal-iskala ta' żmien, jiġifieri test ta' skrinjar biex issir distinzjoni bejn aċidi jew bażijiet dgħajfa u b'saħħithom. Pereżempju, fil-metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat, test ta' kategorizzazzjoni tal-iskala ta' żmien jintuża biex jindika liema miż-żewġ skali ta' żmien għandha tintuża fuq il-bażi ta' jekk tiġix individwata riserva aċida jew alkalina sinifikanti. Żewġ skali ta' żmien tal-infid differenti għandhom jintużaw għad-determinazzjoni tal-korrużività u tas-Subkategorija tal-korrużività tal-ġilda tal-GHS tan-NU, fuq il-bażi tar-riserva aċida jew alkalina tas-sustanza kimika tat-test.

KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-BARRIERA TAL-MEMBRANA

Barriera tal-Membrana

15. Il-barriera tal-membrana tikkonsisti f'żewġ komponenti: ġel milwiem makromolekolari proteiniku u membrana ta' sostenn permeabbli. Il-ġel proteiniku għandu jkun impermeabbli għal-likwidi u għas-solidi iżda jista' jġarrab korrużjoni u jsir permeabbli. Il-barriera tal-membrana mibnija bis-sħiħ għandha tinħażen f'kundizzjonijiet predeterminati murija li jippreġudika deterjorament tal-ġel, *eż.* tnixxif, tkabbir mikrobjali, qlib, qsim, li jkunu jiddegradaw il-prestazzjoni tiegħu. Il-perjodu ta' ħżin aċċettabbli għandu jkun determinat u l-preparati tal-barriera tal-membrana ma għandhomx jintużaw wara dak il-perjodu.

16. Il-membrana ta sostenn permeabbli tipprovdi appoġġ mekkaniku lill-ġel proteiniku matul il-proċess ta' fformar tal-ġel u l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test. Il-membrana ta' sostenn għandha tipprevjeni d-dendil jew il-qlib tal-ġel u għandha tkun permeabbli minnufih għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha.

17. Il-ġel proteiniku, kompost minn proteina, *eż.* keratina, kollaġen, jew taħlitiet ta' proteini, li jifformaw matriċi tal-ġel, iservi bħala l-mira għas-sustanza kimika tat-test. Il-materjal proteiniku jitqiegħed fuq is-superfiċje tal-membrana ta' sostenn u jitħalla jifforma ġel qabel ma l-barriera tal-membrana titqiegħed fuq is-soluzzjoni indikatur. Il-ġel proteiniku għandu jkun ta' ħxuna u densità ugwali kullimkien, u mingħajr bżieżaq tal-arja jew difetti li jistgħu jaffettwaw l-integrità funzjonali tiegħu.

Sistema ta' Detezzjoni tas-Sustanza Kimika (CDS)

18. Is-soluzzjoni indikatur, li hi l-istess soluzzjoni użata għat-test tal-kompatibbiltà, għandha twieġeb għall-preżenza ta' sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw kolorant indikatur tal-pH jew taħlita ta' koloranti, *eż.* aħmar kreżol u oranġjo metil li juru tibdil fil-kulur, bħala tweġiba għall-preżenza tas-sustanza kimika tat-test. Is-sistema tal-kejl tista' tkun viżwali jew elettronika.

19. Is-sistemi ta' detezzjoni li huma żviluppati għad-detezzjoni tal-passaġġ tas-sustanza kimika tat-test mill-membrana barriera għandhom jiġu vvalutati għar-rilevanza u għall-affidabbiltà tagħhom biex tintwera l-firxa ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jiġu individwati u l-limiti kwantitattivi ta' detezzjoni.

TWETTIQ TAT-TEST

Assemblaġġ tal-Komponenti tal-Metodu ta' Ttestjar

20. Il-barriera tal-membrana titqiegħed f'kunjett (jew tubu) li fih is-soluzzjoni indikatur biex il-membrana ta' sostenn tkun f'kuntatt sħiħ mas-soluzzjoni indikatur u mingħajr ebda bużżieqa tal-arja preżenti. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li tinżamm l-integrità tal-barriera.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

21. Ammont xiearq tas-sustanza kimika tat-test, *eż.* 500 µl ta' likwidu jew 500 mg *ta'* solidu miżhun fin (7), jitqiegħed bil-galbu f'saffi fuq is-superfiċje superjuri tal-barriera tal-membrana u jitqassam b'mod ugwali. Numru xieraq ta' repliki, *eż.* erba' (7), jitħejja għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli korrispondenti tagħha (ara l-paragrafi 23 sa 25). Jiġi rreġistrat il-ħin tal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq il-barriera tal-membrana. Biex jiġi żgurat li l-ħinijiet ta' korrużjoni qosra jiġu reġistrati bi preċiżjoni, il-ħinijiet tal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq il-kunjetti tar-repliki jitqassmu fi stadji.

Kejl tal-Penetrazzjonijiet tal-Barriera tal-Membrana

22. Kull kunjett jiġi ssorveljat kif xieraq u l-ħin tal-ewwel tibdil fis-soluzzjoni indikatur, jiġifieri l-penetrazzjoni tal-barriera, jiġi reġistrat, u jiġi determinat il-ħin li jgħaddi bejn l-applikazzjoni u l-penetrazzjoni tal-barriera tal-membrana.

Kontrolli

23. F'testijiet li jinvolvu l-użu ta' veikolu jew ta' solvent bis-sustanza kimika tat-test, il-veikolu jew is-solvent għandhom ikunu kompatibbli mas-sistema tal-barriera tal-membrana, jiġifieri ma jbiddlux l-integrità tas-sistema tal-barriera tal-membrana, u ma għandhomx ibiddlu l-korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Meta applikabbli, kontroll bis-solvent (jew veikolu) għandu jiġi ttestjat fl-istess ħin mas-sustanza kimika tat-test biex tintwera l-kompatibbiltà tas-solvent mas-sistema tal-barriera tal-membrana.

24. Kontroll (korrużiv) pożittiv b'attività ta' korrużività immedjata, *eż.* 110 ± 15 mg idrossidu tas-sodju (Subkategorija Korrużiva 1B tal-GHS tan-NU) (7), għandu jiġi ttestjat fl-istess ħin mas-sustanza kimika tat-test biex jiġi vvalutat jekk is-sistema tat-test hix qed taħdem b'mod aċċettabbli. It-tieni kontroll pożittiv li jkun tal-istess klassi ta' sustanzi kimiċi bħas-sustanza kimika tat-test jista' jkun siewi għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' korrużività relattiv ta' sustanza kimika tat-test korrużiva. Għandu/għandhom jintuża(w) kontroll(i) pożittiv(i) li jkun(u) intermedjarji fil-korrużività tiegħu/tagħhom (*eż.* is-Subkategorija 1B tal-GHS tan-NU) biex jiġu individwati tibdiliet fil-ħin tal-penetrazzjoni li jistgħu jkunu itwal jew iqsar b'mod inaċċettabbli mill-valur referenzjarju stabbilit, li tkun indikazzjoni li s-sistema tat-test mhix qed taħdem kif suppost. Għal dan l-għan, sustanzi kimiċi estremament korrużivi (Subkategorija 1A tal-GHS tan-NU) jew mhux korrużivi ftit li xejn ikunu utli. Sustanza kimika tas-Subkategorija korrużiva 1B tal-GHS tan-NU tkun tippermetti d-detezzjoni ta' ħin ta' penetrazzjoni rapidu wisq jew bil-mod wisq. Korrużiv dgħajjef (Subkategorija 1C tal-GHS tan-NU) jista' jintuża bħala kontroll pożittiv biex titkejjel il-ħila tal-metodu ta' ttestjar li jiddistingwi b'mod konsistenti bejn sustanzi kimiċi ftit li xejn korrużivi u dawk mhux korrużivi. Indipendentement mill-approċċ użat, għandha tiġi żviluppata medda ta' rispons tal-kontroll pożittiv aċċettabbli fuq il-bażi tal-medda storika tal-ħinijiet ta' penetrazzjoni għall-kontroll(i) pożittiv(i) użat(i), bħal ± 2-3 devjazzjonijiet standard medji. F'kull studju, il-ħin eżatt tal-penetrazzjoni għandu jiġi determinat għall-kontroll pożittiv biex ikunu jistgħu jiġu individwati d-devjazzjonijiet barra l-medda aċċettabbli.

25. Kontroll negattiv (mhux korrużiv), *eż.* 10 % aċidu ċitriku, 6 % aċidu propjoniku (7), ukoll għandu jiġi ttestjat fl-istess ħin mas-sustanza kimika tat-test bħala kejl ieħor tal-kontroll tal-kwalità biex tintwera l-integrità funzjonali tal-barriera tal-membrana.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà tal-Istudju

26. Skont il-parametri tal-ħin stabbiliti għal kull waħda mis-Subkategoriji tal-korrużività tal-GHS tan-NU, il-ħin (f'minuti) li jgħaddu bejn l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għall-barriera tal-membrana u l-penetrazzjoni tal-barriera jintuża biex titbassar il-korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Biex studju jitqies aċċettabbli, il-kontroll pożittiv konkorrenti għandu jagħti l-ħin ta' rispons tal-penetrazzjoni mistenni (eż. ħin ta' penetrazzjoni ta' 8-16-il min għall-idrossidu tas-sodju jekk jintuża bħala kontroll pożittiv), il-kontroll negattiv konkorrenti ma għandux ikun korrużiv, u, meta jkun inkluż, il-kontroll bis-solvent konkorrenti la għandu jkun korrużiv u lanqas ma għandu jbiddel il-potenzjal ta' korrużività tas-sustanza kimika tat-test. Qabel ma jużaw b'mod sistematiku xi metodu li jkun konformi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika tagħhom, billi jużaw it-12-il sustanza rrakkomandata fit-Tabella 2. Għal metodi ġodda "me-too" żviluppati fl-ambitu ta' dan il-metodu ta' ttestjar li jkunu strutturalment u funzjonalment simili għall-metodu ta' riferiment validat (14), għandhom jintużaw l-istandards tal-prestazzjoni predefiniti biex jintwerew l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tal-metodu l-ġdid qabel l-użu tiegħu għall-ittestjar regolatorju (10).

Interpretazzjoni tar-Riżultati u tal-Klassifikazzjoni tal-Korrużività tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

27. Il-ħin (f'minuti) li jgħaddi bejn l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għall-barriera tal-membrana u l-penetrazzjoni tal-barriera jintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata f'termini tas-Subkategoriji korrużivi tal-GHS tan-NU (1) u, jekk applikabbli, tal-Grupp tal-Imballaġġ tan-NU (16). Il-valuri tal-ħin ta' limitu għal kull waħda mit-tliet subkategoriji korrużivi huma stabbiliti għal kull metodu ta' ttestjar propost. Id-deċiżjonijiet finali dwar il-ħinijiet ta' limitu għandhom jikkunsidraw il-ħtieġa li tiġi minimizzata s-sottoklassifikazzjoni tal-periklu korrużiv (jiġifieri negattivi foloz). Fil-linja gwida tat-test preżenti, għandhom jintużaw il-ħinijiet ta' limitu ta' Corrositex® kif deskritti fit-tabella 3 peress li dan jirrappreżenta l-uniku metodu ta' ttestjar li bħalissa jaqa' fi ħdan il-linja gwida tat-test (7).

Tabella 3

Mudell ta' tbassir Corrositex®

Ħin medju tal-penetrazzjoni (min.)		Tbassir tal-GHS tan-NU [3]
Sustanzi kimiċi tat-test tal-kategorija 1 [1] (determinati mit-test ta' kategorizzazzjoni tal-metodu)	Sustanzi kimiċi tat-test tal-kategorija 2 [2] (determinati mit-test ta' kategorizzazzjoni tal-metodu)	
0-3 min.	0-3 min.	Korrużivi Subkategorija fakultattiva 1A
> 3 sa 60 min.	> 3 sa 30 min.	Korrużivi Subkategorija fakultattiva 1B
> 60 sa 240 min.	> 30 sa 60 min.	Korrużivi Subkategorija fakultattiva 1C
> 240 min.	> 60 min.	Mhux korrużivi

[1] Sustanzi kimiċi tat-test b'riserva aċida/alkalina għolja (6)
[2] Sustanzi kimiċi tat-test b'riserva aċida/alkalina baxxa (6)
[3] Is-subkategoriji 1A, 1B u 1C tal-GHS tan-NU jikkorrispondu għall-gruppi tal-imballaġġ I, II u III tan-NU rispettivament

DATA U RAPPORTAR

*Data*28.
Il-ħin (f'minuti) li jgħaddi bejn l-applikazzjoni u l-penetrazzjoni tal-barriera għas-sustanza kimika tat-test u l-kontroll(i) pożittiv(i) għandu jiġi rapportat f'forma tabulari bħala *data* dwar ir-replikati individwali, kif ukoll ifisser id-devjazzjoni standard ± għal kull prova.

Rapport tat-Test

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

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll:

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti;

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— Is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;

— It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tas-sustanza tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż., it-tisħin, it-tħin);

— L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, id-data ta' limitu għall-użu, jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin.

Veikolu:

— L-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (fejn xieraq), il-volum użat;

— Il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

Il-mudell u l-protokoll tal-barriera tal-membrana in vitro użati, inklużi l-preċiżjoni u l-affidabbiltà murija

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Deskrizzjoni tal-apparat u tal-proċeduri ta' tħejjija użati;

— Sors u kompożizzjoni tal-barriera tal-membrana *in vitro* użati;

— Kompożizzjoni u proprjetajiet tas-soluzzjoni indikatur;

— Metodu ta' detezzjoni;

— Ammonti tas-sustanza kimika tat-test u sustanzi tal-kontroll;

— Numru ta' repliki;

— Deskrizzjoni u ġustifikazzjoni għat-test ta' kategorizzazzjoni tal-iskala ta' żmien;

— Metodu tal-applikazzjoni;

— Ħinijiet ta' osservazzjoni.

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' klassifikazzjoni applikati;

— Wiri ta' profiċjenza fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar qabel użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza.

Ir-riżultati:

— Tabulazzjoni tad-*data* mhux proċessata individwali mit-test u mill-kampjuni tal-kontroll individwali għal kull replikat;

— Deskrizzjonijiet ta' effetti oħra osservati;

— Il-klassifikazzjoni derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, NU New York u Ġinevra, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Il-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni, Korrużjoni Dermali Akuta.

(3) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-ġilda *in vitro*: metodu ta' ttestjar tal-epidermis uman rikostitwit (RHE).

(4) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda *In Vitro*. Ir-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/ Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. u Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. u Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Dikjarazzjoni dwar l-Applikazzjoni tal-Assaġġ CORROSITEX® għall-Ittestjar tal-Korrużività tal-Ġilda. Il-15-il Laqgħa tal-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-ECVAM (ESAC), Ispra, l-Italja. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (l-20 ta' Settembru 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Kapitolu B.46 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Epidermis Uman Rikostitwit. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponibbli fuq: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponibbli fuq: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) In-Nazzjonijiet Uniti (NU) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Parti, Kapitolu 2.8), UN, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' 'konkordanza' sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (9).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Sistema ta' Detezzjoni tas-Sustanza Kimika (CDS): Sistema ta' kejl viżwali jew elettronika b'soluzzjoni indikatur li twieġeb għall-preżenza ta' sustanza kimika tat-test, *eż.* b'tibdil f'kolorant indikatur tal-pH, jew f'taħlita ta' koloranti, li juru tibdil fil-kulur bħala tweġiba għall-preżenza tas-sustanza kimika tat-test jew b'tipi oħra ta' reazzjonijiet kimiċi jew elettrokimiċi.

Konkordanza: Dan hu kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar għal metodi ta' ttestjar li jagħtu riżultat kategoriku, u hu aspett wieħed tar-rilevanza. It-terminu kultant jintuża b'mod interkambjabbli mal-akkuratezza, u hu definit bħala l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi kollha ttestjati li jiġu klassifikati kif suppost bħala pożittivi jew negattivi. Il-konkordanza hi ferm dipendenti fuq il-prevalenza tal-pożittivi fit-tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test li jkunu qed jiġu eżaminati (9).

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

IATA: Approċċ Integrat għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

NC: Mhux korrużiva.

Standards tal-prestazzjoni: Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inklużi hemm (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' affidabbiltà u ta' akkuratezza, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (9).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tal-metodu ta' ttestjar mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (9).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hi vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (9).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

Korrużjoni tal-ġilda *in vivo*: Il-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fil-ġilda; jiġifieri nekrożi viżibbli mill-*epidermis* u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma kkaratterizzati minn ulċeri, fsad, qxur bid-demm, u, fit-tmiem tal-osservazzjoni fl-14-il jum, minn skulurazzjoni minħabba t-tibjid tal-ġilda, żoni sħaħ b'alopeċja, u ċikatriċi. L-istopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (9).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

B.66 **ASSAĠĠI *IN VITRO* TA' TRANSATTIVAZZJONI TRANSFETTATI B'MOD STABBLI BIEX JIĠU INDIVIDWATI AGONISTI U ANTAGONISTI RIĊETTURI TAL-ESTROĠENU**

INTRODUZZJONI ĠENERALI

Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni tal-OECD

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 455 tal-OECD (2016). It-TG 455 hi linja gwida tat-test ibbażata fuq il-prestazzjoni (PBTG), li tiddeskrivi l-metodoloġija ta' Assaġġi *In Vitro* ta' Transattivazzjoni Transfettati b'Mod Stabbli biex jiġu individwati Agonisti u Antagonisti Riċetturi tal-Estroġenu (assaġġi TA tal-ER). Din tinkludi diversi metodi ta' ttestjar mekkanistikament u funzjonalment simili għall-identifikazzjoni tal-agonisti u tal-antagonisti riċetturi tal-estroġenu (jiġifieri ERα, u/jew ERβ) u għandha tiffaċilita l-iżvilupp ta' metodi ta' ttestjar simili jew modifikati ġodda skont il-prinċipji għall-validazzjoni stabbiliti fl-OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). Il-metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ (Appendiċi 2 u Appendiċi 3) li jipprovdu l-bażi għal din il-PBTG huma:

   — L-assaġġ TA Transfettat b'Mod Stabbli (STTA) (2) bl-użu tal-linja ta' ċelloli (h) ERα-HeLa-9903; u

   — L-assaġġ TA tal-ER VM7Luc (3) bl-użu tal-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2 ([28]) li b'mod predominanti jesprimi hERα b'xi kontribuzzjoni minn hERβ(4)(5).

   Għall-iżvilupp u għall-validazzjoni ta' assaġġi simili għall-istess punt ta' tmiem tal-periklu, hemm disponibbli standards tal-prestazzjoni (PS) (6) (7) u dawn għandhom jintużaw. Dawn jippermettu għall-emendar puntwali tal-PBTG 455 biex l-assaġġi simili l-ġodda jkunu jistgħu jiżdiedu ma' PBTG aġġornata; madankollu, assaġġi simili jiżdiedu bis wara rieżami u qbil mill-OECD li ntlaħqu l-istandards tal-prestazzjoni. L-assaġġi inklużi fit-TG 455 jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jiġu indirizzati r-rekwiżiti tal-pajjiżi membri tal-OECD għar-riżultati tat-testijiet dwar it-transattivazzjoni tar-riċettur tal-estroġenu filwaqt li jinkiseb benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD.

Sfond u prinċipji tal-assaġġi inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar

2. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi linji gwida dwar it-testijiet eżistenti, u tiżviluppa ġodda, għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali. Il-qafas kunċettwali (CF) tal-OECD għall-ittestjar u għall-valutazzjoni ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali ġie rivedut fl-2012. Is-CFs oriġinali u riveduti huma inklużi bħala Annessi fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Linji Gwida tat-Testijiet Standardizzati għall-Evalwazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi għall-Interferenza Endokrinali (8). Is-CF jinkludi ħames livelli, b'kull livell li jikkorrispondi għal livell differenti ta' kumplessità bijoloġika. L-assaġġi tat-transattivazzjoni (TA) tal-ER deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar huma l-livell 2, li jinkludi *assaġġi in vitro li jipprovdu data dwar il-mekkaniżmu/i/il-perkors(i) endokrinali magħżula*. Dan il-metodu ta' ttestjar hu għall-assaġġi ta' Transattivazzjoni (TA) *in vitro* mfassla biex jidentifikaw agonisti u antagonisti tar-riċetturi tal-estroġenu (ER).

3. L-interazzjoni tal-estroġeni mal-ERs tista' taffettwa t-traskrizzjoni tal-ġeni kkontrollati mill-estroġenu, li tista' twassal għall-induzzjoni jew għall-inibizzjoni ta' proċessi ċellolari, inklużi dawk neċessarji għall-proliferazzjoni taċ-ċelloli, għall-iżvilupp normali tal-fetu, u għall-funzjoni riproduttiva (9)(10)(11). Il-perturbazzjoni ta' sistemi estroġeniċi normali jista' jkollha l-potenzjal li tiskatta effetti avversi fuq l-iżvilupp normali (ontoġenesi), is-saħħa riproduttiva u l-integrità tas-sistema riproduttiva.

4. L-assaġġi TA *in vitro* huma bbażati fuq interazzjoni diretta jew indiretta tas-sustanzi ma' riċettur speċifiku li jirregola t-traskrizzjoni ta' prodott ta' ġene indikatur. Assaġġi bħal dawn intużaw b'mod estensiv għall-evalwazzjoni tal-espressjoni ġenika regolata minn riċetturi nukleari speċifiċi, bħall-ERs (12) (13) (14) (15) (16). Dawn ġew proposti għad-detezzjoni tat-transattivazzjoni estroġenika regolata mill-ER (17) (18) (19). Hemm tal-anqas żewġ subtipi ewlenin ta' ERs nukleari, α u β, li huma kodifikati minn ġeni distinti. Il-proteini rispettivi għandhom funzjonijiet bijoloġiċi differenti kif ukoll distribuzzjonijiet tat-tessuti u affinitajiet għall-irbit ligandi differenti (20)(21)(22)(23)(24)(25)(26). L-ERα nukleari jimmedja r-rispons estroġeniku klassiku (27)(28)(29)(30), u għalhekk ħafna mill-mudelli li qed jiġu żviluppati bħalissa għall-kejl tal-attivazzjoni jew tal-inibizzjoni atl-ER huma speċifiċi għall-ERα. L-assaġġi jintużaw biex jidentifikaw sustanzi kimiċi li jattivaw (jew jinibixxu) l-ER wara li jsiruleganti

([28]) Qabel Ġunju 2016, din il-linja ta' ċelloli kienet imsejħa l-linja ta' ċelloli BG1Luc. Iċ-ċelloli BG-1 oriġinarjament kienu deskritti minn Geisinger et al. (1998) (35) u aktar tard ġew karatterizzati mir-riċerkaturi fin-National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). B'mod relattivament riċenti, ġie skopert li jeżistu żewġ varjanti differenti taċ-ċelloli BG-1 li jintużaw mir-riċerkaturi, BG-1 Fr u BG-1 NIEHS. Analiżi approfondita, li tinkludi ttestjar tad-DNA, ta' dawn iż-żewġ linji ta' ċelloli varjanti tal-BG-1 saret minn Li u l-kollegi (2014) (37) uriet li l-BG-1 Fr kienet unika u li l-BG-1 NIEHS, jiġifieri l-linja ta' ċelloli oriġinali użata għall-iżvilupp tal-assaġġ, ma kinitx il-linja ta' ċelloli tal-karċinoma ovarjana umana BG1, iżda minflok kienet varjant tal-linja ta' ċelloli tal-kanċer tas-sider uman MCF7. Il-linja ta' ċelloli użata fl-assaġġ, oriġinarjamen imsejħa BG1Luc4E2 (38), issa se tibda tissejjaħ VM7Luc4E2 ("V" = varjant; "M7" = ċelloli MCF7). Bl-istess mod, l-assaġġ issa se jibda jissejjaħ it-TA tal-ER VM7Luc. Filwaqt li dan ibiddel l-oriġini tal-linja ta' ċelloli li fuqha hu bbażat l-assaġġ, dan ma jaffettwax l-istudji ta' validazzjoni ppubblikati u lanqas l-utilità u l-applikazzjoni ta' dan l-assaġġ għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi/antiestroġeniċi.

ligandi, wara liem il-kumpless riċettur-ligand jillega ma' elementi ta' rispons speċifiċi tad-DNA u jittransattiva ġene indikatur, li jirriżulta f'espressjoni ċellolari akbar ta' proteina markatur. F'dawn l-assaġġi jistgħu jintużaw risponsi indikaturi differenti. F'sistemi bbażati fuq luċiferaži, l-enzima luċiferaži tittrasaforma s-substrat luċiferin fi prodott bijoluminexxenti li jista' jitkejjel b'mod kwantitattiv b'luminometru. Eżempji oħra ta' indikaturi komuni huma proteina fluworexxenti u l-ġene *LacZ*, li jikkodifika l-β-galaktosidaži, enzima li tista' tittrasfroma s-substrat bla kulur X-gal (5- bromo-4-kloro-indolil-galaktopiranosid) fi prodott blu li jista' jiġi kwantifikat bi spettrofotometru. Dawn l-indikaturi jistgħu jiġu evalwati malajr u mingħajr ma jintefqu wisq flus b'kits tat-test disponibbli kummerċjalment.

5. Studji ta' validazzjoni tal-STTA u l-assaġġi tat-TA VM7Luc urew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tagħhom għall-iskop maħsub tagħhom (3)(4)(5)(30). L-istandards tal-prestazzjoni għal assaġġi TA tal-ER ibbażati fuq il-luminexxenza li jużaw linji ta' ċelloli tas-sider huma inklużi fir-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL® ER (TA tal-ER VM7Luc). Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3). Dawn l-istandards tal-prestazzjoni ġew modifikati biex ikunu applikabbli kemm għall-assaġġi STTA kif ukoll TA VM7Luc (2).

6. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

Ambitu u limitazzjonijiet relatati mal-assaġġi TA

7. Dawn l-assaġġi qed jiġu proposti għall-finijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni, iżda jistgħu jipprovdu wkoll informazzjoni mekkanistika li tista' tintuża f'approċċ ta' piż tal-evidenza. Dawn jindirizzaw TA indott b'irbit kimiku mal-ERs f'sistema *in vitro*. B'hekk, ir-riżultati ma għandhomx jiġu estrapolati direttament għas-sinjalar u għar-regolamentazzjoni kumplessi tas-sistema endokrinali intatta *in vivo*.

8. TA medjat mill-ERs jitqies wieħed mill-mekkaniżmi ewlenin tal-interferenza endokrinali (ED), għalkemm hemm mekkaniżmi oħra li bihom tista' sseħħ l-ED, inklużi (i) interazzjonijiet ma' riċetturi u ma' sistemi enzimatiċi oħra fi ħdan is-sistema endokrinali, (ii) sinteżi ormonali, (iii) attivazzjoni metabolika u/jew inattivazzjoni tal-ormoni, (iv) distribuzzjoni tal-ormoni għat-tessuti fil-mira, u (v) tneħħija tal-ormoni mill-ġisem. L-ebda wieħed mill-assaġġi taħt dan il-metodu ta' ttestjar ma jindirizza dawn il-modalitajiet ta' azzjoni.

9. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-ħila tas-sustanzi kimiċi li jattivaw (jiġifieri jaġixxu bħala agonisti) kif ukoll irażżnu (jiġifieri jaġixxu bħala antagonisti) traskrizzjoni dipendenti mill-ER. Ċerti sustanzi kimiċi jistgħu juru, b'mod dipendenti fuq it-tip ta' ċellola, kemm attività agonista kif ukoll antagonista u huma magħrufa bħala modulaturi selettivi tar-riċetturi tal-estroġenu (SERMs). Is-sustanzi kimiċi li huma negattivi f'dawn l-assaġġi jistgħu jiġu evalwati f'assaġġ tal-irbit tal-ER qabel ma jiġi konkluż li s-sustanza kimika ma tillegax mar-riċettur. Barra minn hekk, l-assaġġi aktarx li jinformaw biss dwar l-attivtà tal-molekola omm fid-dawl tal-kapaċitajiet metabolizzanti limitati tas-sistemi ċellolari *in vitro*. Peress li ntużaw sustanzi singli biss matul il-validazzjoni, l-applikabbiltà għat-taħlitiet tat-test ma ġietx indirizzata. Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda hu teorikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti, ta' UVCBs u ta' taħlitiet. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq sustanza multikostitwenti, UVCB jew taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

10. Għal-finijiet ta' informazzjoni, it-Tabella 1 tipprovdi r-riżultati tat-test tal-agonisti għall-34 sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, 26 huma klassifikati bħala agonisti definittivi tal-ER u tmienja negattivi fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġi *in vitro* għall-irbit mal-ER u t-TA, u/jew l-assaġġ uterotrofiku (2)(3)(18)(31)(32)(33)(34). It-Tabella 2 tipprovdi r-riżultati tat-test tal-antagonisti għall-15-il sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, erbgħa huma klassifikati bħala agonisti definittivi/preżunti tal-ER u 10 negattivi fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġi *in vitro* għall-irbit mal-ER u t-TA (2)(3)(18)(31). B'referenza għad-*data* miġbura fil-qosor fit-Tabella 1 u fit-Tabella 2, kien hemm qbil ta' 100 % bejn iż-żewġ metodi ta' ttestjar ta' riferiment dwar il-klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kollha ħlief sustanza waħda (mifepristone) għall-assaġġ tal-antagonisti, u kull sustanza ġiet klassifikata kif suppost bħala agonist/antagonist tal-ER jew negattiva. Informazzjoni supplimentari dwar dan il-grupp ta' sustanzi kimiċi kif ukoll sustanzi kimiċi addizzjonali ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc matul l-istudji ta' validazzjoni hi pprovduta fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-ERTA (6)(7), fl-Appendiċi 2 (Tabelli 1, 2 u 3).

Tabella 1

Ħarsa ġenerali lejn ir-Riżultati mill-Assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc għas-Sustanzi Ttestjati fiż-Żewġ Assaġġi Agonisti u Klassifikati bħala Agonisti tal-ER (POŻ) jew Negattivi (NEG)

	Sustanza	CASRN	Assaġġ (1) STTA			Assaġġ (2) TA tal-ER VM7Luc		Sors tad-*Data* għall-Klassifikazzjoni (4)		
			TA tal-ER Attività	Valur PC_{10} (M)	Valurb PC_{50} (b) (M)	Attività TA tal-ER	Valurb,3 EC_{50} (b), (3) (M)	TAs (c) tal-ER Ohrajn	ER Leganti	Uterotrofiċi
1	17ß-estradjol (a)	50-28-2	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	POŻ	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POŻ (227/227)	POŻ	POŻ
2	17α-estradjol (a)	57-91-0	POŻ	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POŻ	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POŻ(11/11)	POŻ	POŻ
3	17α-etinil estradjol (a)	57-63-6	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	POŻ	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POŻ(22/22)	POŻ	POŻ
4	17β-trenbolon	10161-33-8	POŻ	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POŻ	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POŻ (2/2)	NT	NT
5	19-nortestosterone (a)	434-22-0	POŻ	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POŻ	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POŻ(4/4)	POŻ	POŻ
6	4-kumilfenol (a)	599-64-4	POŻ	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POŻ	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POŻ(5/5)	POŻ	NT
7	4-*terz*-ottilfenol (a)	140-66-9	POŻ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POŻ	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POŻ(21/24)	POŻ	POŻ
8	Apiġenin (a)	520-36-5	POŻ	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POŻ	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POŻ(26/26)	POŻ	NT

	Sustanza	CASRN	Assaġġ (1) STTA			Assaġġ (2) TA tal-ER VM7Luc		Sors tad-*Data* għall-Klassifikazzjoni (4)		
			TA tal-ER Attività	Valur PC_{10} (M)	Valurb PC_{50} (b) (M)	Attività TA tal-ER	Valurb,3 EC_{50} (b), (3) (M)	TAs (c) tal-ER Ohrajn	ER Leganti	Uterotrofiċi
9	Atrażine (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisfenol A (a)	80-05-7	POŻ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POŻ	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POŻ (65/65)	POŻ	POŻ
11	Bisfenol B (a)	77-40-7	POŻ	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POŻ	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POŻ(6/6)	POŻ	POŻ
12	Butilbenżil ftalate (a)	85-68-7	POŻ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POŻ	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POŻ(12/14)	POŻ	NEG
13	Kortikosterone (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG(6/6)	NEG	NT
14	Koumestrol (a)	479-13-0	POŻ	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POŻ	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POŻ(30/30)	POŻ	NT
15	Daidżein (a)	486-66-8	POŻ	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POŻ	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POŻ(39/39)	POŻ	POŻ
16	Dietilstilbestrol (a)	56-53-1	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POŻ	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POŻ(42/42)	POŻ	NT
17	Ftalat tad-di-n-butil	84-74-2	POŻ	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POŻ	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POŻ(6/11)	POŻ	NEG
18	Etil paraben	120-47-8	POŻ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(ebda PC_{50})	POŻ	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POŻ		NT
19	Estrone (a)	53-16-7	POŻ	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POŻ	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POŻ(26/28)	POŻ	POŻ
20	Ġenistein (a)	446-72-0	POŻ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POŻ	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POŻ(100/102)	POŻ	POŻ

	Sustanza	CASRN	Assaġġ (1) STTA			Assaġġ (2) TA tal-ER VM7Luc		Sors tad-*Data* għall-Klassifikazzjoni (4)		
			TA tal-ER Attività	Valur PC_{10} (M)	Valurb PC_{50} (b) (M)	Attività TA tal-ER	Valurb,3 EC_{50} (b), (3) (M)	TAs (c) tal-ER Ohrajn	ER Leganti	Uterotrofici
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kempferol (a)	520-18-3	POŻ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POŻ	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POŻ(23/23)	POŻ	NT
23	Kepone (a)	143-50-0	POŻ	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POŻ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POŻ(14/18)	POŻ	NT
24	Ketokonażol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	*meso*-Eżestrol (a)	84-16-2	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POŻ	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POŻ(4/4)	POŻ	NT
27	Metil testosterone (a)	58-18-4	POŻ	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POŻ	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POŻ(5/6)	POŻ	NT
28	Morin	480-16-0	POŻ	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POŻ	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POŻ(2/2)	POŻ	NT
29	Noretinodrel (a)	68-23-5	POŻ	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POŻ	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POŻ(5/5)	POŻ	NT
30	*p,p'*-Metossiklor (a)	72-43-5	POŻ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(ebda PC_{50}) (b)	POŻ	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POŻ(24/27)	POŻ	POŻ
31	Fenobarbital (a)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(2/2)	NEG	NT

	Sustanza	CASRN	Assaġġ ([1]) STTA			Assaġġ ([2]) TA tal-ER VM7Luc		Sors tad-*Data* għall-Klassifikazzjoni ([4])		
			TA tal-ER Attività	Valur PC_{10} (M)	Valurb PC_{50} ([b]) (M)	Attività TA tal-ER	Valurb,3 EC_{50} ([b]), ([3]) (M)	TAs ([c]) tal-ER Ohrajn	ER Leganti	Uterotrofici
32	Reserpina	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
33	Spironolattone ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG(4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POŻ	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POŻ	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POŻ(5/10)	POŻ	NT

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; EC_{50} = konċentrazzjoni effettiva medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negatttivi; POŻ = pożittivi; NT = Mhux ittestjati; PC_{10} (u PC_{50}) = il-konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li fiha r-rispons ikun 10 % (jew 50 % għall-PC_{50}) tar-rispons indott mill-kontroll pożittiv (E2, 1nM) f'kull pjastra.

([a]) Sustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati agonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (Rapport ta' Evalwazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc tal-ICCVAM, Tabella 4-1 (3).

([b]) Il-konċentrazzjoni massima ttestjata fin-nuqqas ta' limitazzjonijiet minħabba ċitotossiċità jew insolubbiltà kienet ta' 1×10^{-5} M (Assaġġ STTA) u ta' 1×10^{-3} M (Assaġġ TA tal-ER VM7Luc).

([c]) In-numru fil-parentesi jirrappreżenta r-riżultati tat-test klassifikati bħala pożittivi (POŻ) jew negattivi (NEG) min-numru totali ta' studji referenzjati.

([1]) Valuri rrapportati fl-Abbozz tar-Rapport ta' Prevalidazzjoni u Validazzjoni Interlaboratorji għall-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali (TA) Transfettata biex tiġi Individwata Attività Estroġenika - L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Medjat tar-Reċettur Alfa tal-Estroġenu Uman Bl-Użu tal-Linja Ċelolari hER-HeLa-9903 (2)

([2]) Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL® ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3)

([3]) Il-valuri medji tal-EC_{50} ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

([4]) Klassifikazzjoni bħala agonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-metodi ta' ttestjar tal-Irbit tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).
Noti: L-ebda assaġġ fi ħdan dan il-metodu ta' ttestjar ma fih l-istess kejlijiet. Fċerti sitwazzjonijiet, l-EC_{50} ma tkunx tista' tiġi kkalkolata għaliex ma tkunx ġiet ġenerata kurva ta' doża-rispons sħiħa. Filwaqt li bl-assaġġ STTA, il-valur tal-PC_{10} hu kejl importanti, jista' jkun hemm ukoll eżempji oħra li fihom PCx tipprovdi informazzjoni siewja.

Tabella 2

Tqabbil tar-Riżultati mill-Assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc għas-Sustanzi Ttestjati fiż-Żewġ Assaġġi Antagonisti u Klassifikati bħala Antagonisti tal-ER (POŻ) jew Negattivi (NEG)

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])		Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])		STTA tal-ER kandidat effetti ([4])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]) (M)	TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
1	4-idrossitamossifen	68047-06-3	POŻ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POŻ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	POŻ moderati	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
2	Dibenżo[a.h]antraċen	53-70-3	POŻ	Ebda IC_{50}	POŻ	Ebda IC_{50}	POŻ	PP	Kompost Poliċikliku	Sustanza Kimika tal-Laboratorju, Prodott Naturali
3	Mifepriston	84371-65-3	POŻ	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	POŻ ħfief	NEG	Sterojde	Farmaċewtiku
4	Ralossifen HCl	82640-04-8	POŻ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POŻ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	POŻ moderati	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
5	Tamossifen	10540-29-1	POŻ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POŻ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POŻ	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
6	17β-estradjol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	NP	NP	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
7	Apiġenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Kompost Eteroċikliku	Kolorant, Prodott Naturali, Intermedjarju Farmaċewtiku

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])		Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])		STTA tal-ER kandidat effetti ([4])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]) (M)	TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
8	Atrażina	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	NP	Kompost Eteroċikliku	Erbiċida
9	Ftalat tad-di-n-butil	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, Aċidu Ftaliku	Ingredjent Kożmetiku, Sustanza Kimika Industrijali, Plastifikant
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	mhux ittestjat	NP	Komposti Eteroċikliċi, Pirimidina	Fungiċida
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	NP	NP	Flavonojde, Kompost Eteroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
12	Flutammid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	NP	Ammid	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
13	Ġenisteina	446-72-0	NEG	—	NEG	—	NP	NEG	Flavonojde, Kompost Eteroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
14	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	mhux ittestjat	NEG	Fenol	Intermedjarju Kimiku

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])		Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])		STTA tal-ER kandidat effetti ([4])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]) (M)	TA tal-ER Attività	Valur tal-IC_{50} ([b]), ([3]) (M)				
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	—	NP	NEG	Idrokarbur (Ċikliku)	Prodott Naturali

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; IC_{50} = konċentrazzjoni inibitorja medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negatttivi; NP = negattivi preżunti; POŻ = pożittivi; PP = pożittivi preżunti.

([a]) Sustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati antagonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (2) (3).

([b]) Il-konċentrazzjoni massima ttestjata fin-nuqqas ta' limitazzjonijiet minħabba ċitotossiċità jew insolubbiltà kienet ta' 1×10^{-3} M (Assaġġ STTA) u ta' 1×10^{-5} M (Assaġġ TA tal-ER VM7Luc).

([1]) Ir-Rapport ta' Validazzjoni tal-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali transfettata b'Mod Stabbli biex tiġi Individwata Attività medjata mill-ER, Parti B (2)

([2]) Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL® ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3).

([3]) Il-valuri medji tal-EC_{50} ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

([4]) Attività STTA tal-ER preżunta mill-effetti rapportati tagħhom magħrufa mid-*data* storika tas-CERI tal-assaġġ dwar l-irbit tar-riċettur tal-ER, l-assaġġ uterotrofiku u l-informazzjoni miġbura mid-dokumentazzjoni disponibbli (2)

([5]) Klassifikazzjoni bħala antagonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbit tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bank ta' *Data* tas-Sustanzi Perikolużi tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER

Komponenti Essenzjali tal-Assaġġ

11. Dan il-metodu ta' ttestjar japplika għal assaġġi li jużaw riċettur tal-ERα transfettat b'mod stabbli jew endoġenu u binja ta' ġene indikatur transfettat b'mod stabbli taħt il-kontroll ta' element ta' rispons tal-estroġenu wieħed jew aktar; madankollu, jistgħu jkunu preżenti riċetturi oħra bħall-ERβ. Dawn huma komponenti essenzjali tal-assaġġ.

Kontrolli

12. Il-bażi għall-istandards referenzjarji konkorrenti proposti għal kull assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti għandha tkun deskritta. Il-kontrolli konkorrenti (negattivi, solvent, u pożittivi), kif xieraq, iservu bħala indikazzjoni li l-assaġġ hu operattiv skont il-kundizzjonijiet tat-test u jipprovdu bażi għal tqabbil bejn esperiment u ieħor; normalment dawn ikunu parti mill-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari (1).

Proċeduri Standard ta' Kontroll tal-Kwalità

13. Il-proċeduri standard ta' kontroll tal-kwalità għandhom jitwettqu kif deskritt għal kull assaġġ biex jiġi żgurat li l-linja ta' ċelloli tibqa' stabbli matul diversi passaġġi, tibqa' ħielsa mill-mikoplażma (jiġifieri ħielsa minn kontaminazzjoni batterjali), u żżomm il-ħila li tipprovdi r-risponsi medjati mill-ER mistennija maż-żmien. Il-linji ta' ċelloli għandhom ikomplu jiġu verifikati għall-identità korretta tagħhom kif ukoll għal kontaminanti oħra (eż. fungi, ħmira u vajrusis).

Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju

14. Qabel l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi mhux magħrufa bi kwalunkwe wieħed mill-assaġġi f'dan il-metodu ta' ttestjar, kull laboratorju għandu juri profiċjenza fl-użu tal-assaġġ. Biex juri l-profiċjenza, kull laboratorju għandu jittestja l-14-il sustanza ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 3 għall-assaġġ tal-agonisti u 10 sustanzi ta' profiċjenza fit-Tabella 4 għall-assaġġ tal-antagonisti. Dan l-ittestjar tal-profiċjenza jikkonferma r-risponsività tas-sistema tat-test ukoll. Il-lista ta' sustanzi ta' profiċjenza hi subsett tas-sustanzi ta' riferiment pprovduti fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġi TA tal-ER (6). Dawn is-sustanzi huma kummerċjalment disponibbli, jirrappreżentaw il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi assoċjati komunement mal-attività agonista jew antagonista tal-ER, jesibixxu firxa xierqa ta' potenza mistennija għall-agonisti/antagonisti tal-ER (jiġifieri b'saħħithom sa dgħajfa) u jinkludu negattivi. L-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza għandu jerġa' jsir tal-anqas darbtejn, f'jiem differenti. Il-profiċjenza tintwera bil-klassifikazzjoni korretta (pożittiva/negattiva) ta' kull sustanza ta' profiċjenza. L-ittestjar tal-profiċjenza għandu jerġa' jsir minn kull tekniku meta jkun qed jitgħallem l-assaġġi. Skont it-tip ta' ċellola, uħud minn dawn is-sustanzi ta' profiċjenza jafu jġibu ruħhom bħala SERMs u juru attività kemm bħala agonisti kif ukoll bħala antagonisti. Madankollu, is-sustanzi ta' profiċjenza huma klassifikati fit-Tabelli 3 u 4 skont l-attività predominanti magħrufa tagħhom li għandha tintuża għall-evalwazzjoni tal-profiċjenza.

15. Biex tintwera l-prestazzjoni u għall-finijiet ta' kontroll tal-kwalità, kull laboratorju għandu jiġbor bażijiet ta' *data* storiċi dwar l-agonisti u l-antagonisti bi b'*data* ta' riferiment standard (eż. 17β-estradjol u tamossifen), dwar is-sustanzi kimiċi tal-kontrolli pożittivi u negattivi u dwar il-kontroll bis-solvent (eż. DMSO). Bħala bidu, il-bażi ta' *data* għandha tiġi ġenerata minn tal-anqas 10 sessjonijiet indipendenti tal-agonisti (eż. 17β-estradjol) u 10 sessjonijiet indipendenti tal-antagonisti (eż. tamossifen). Ir-riżultati mill-analiżijiet futuri ta' dawn l-istandards referenzjarji u l-kontrolli bis-solvent għandhom jiżdiedu biex ikabbru l-bażi ta' *data* bl-għan li jiġu żgurati konsistenza u twettiq tal-bijoassaġġ mil-laboratorju matul iż-żmien.

Tabella 3

Lista ta' (14) Sustanzi ta' Proficjenza għall-assaġġ tal-agonisti [1]

Nru [8]	Sustanza	CASRN	Rispons Mistenni [2]	Assaġġ STTA			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc		Klassi Kimika tal-MeSH [6]	Klassi tal-Prodott [7]
				Valur tal-PC_{10} (M) [3]	Valur tal-PC_{50} (M) [3]	Medda ta' Konċ. tat-Test (M)	Valur tal-VM7Luc EC_{50} (M) [4]	L-Oghla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) [5]		
14	Dietilstilbestrol	56-53-1	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
12	17α-estradjol	57-91-0	POŻ	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
15	*meso*-Eżestrol	84-16-2	POŻ	$< 1{,}00 \times 10^{-1-1}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Idrokarbur (Ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
11	4-*terz*-Ottilfenol	140-66-9	POŻ	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenol	Intermedjarju Kimiku
9	Ġenisteina	446-72-0	POŻ	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
6	Bisfenol A	80-05-7	POŻ	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenol	Intermedjarju Kimiku

Nru ([8])	Sustanza	CASRN	Rispons Misteni ([2])	Assaġġ STTA			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc		Klassi Kimika tal-MeSH ([6])	Klassi tal-Prodott ([7])
				Valur tal-PC_{10} (M) ([3])	Valur tal-PC_{50} (M) ([3])	Medda ta' Konċ. tat-Test (M)	Valur tal-VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	L-Ogħla Konċ. ghas-Sejbien tal-Medda (M) ([5])		
2	Kempferolina	520-18-3	POŻ	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali
3	Ftalat tal-butil-benżil	85-68-7	POŻ	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Aċidu Karbossiliku, Ester, Aċidu Ftaliku	Plastifikant, Sustanza Kimika Industrijali
4	*p,p'*- Metossiklor	72-43-5	POŻ	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Idrokarbur (Aloġenat)	Pestiċida, Aġent Veterinarju
1	Etil paraben	120-47-8	POŻ	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Aċidu Karbossiliku, Fenol	Farmaċewtiku, Preservattiv
17	Atrażina	1912-24-9	NEG	—	—	$10^{-10} - 10^{-4}$	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Kompost Eteroċikliku	Erbiċida
20	Spironolatton	52-01-7	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Latton, Sterojde	Farmaċewtiku

Nru ([8])	Sustanza	CASRN	Rispons Misteni ([2])	Assaġġ STTA			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc		Klassi Kimika tal-MeSH ([6])	Klassi tal-Prodott ([7])
				Valur tal-PC_{10} (M) ([3])	Valur tal-PC_{50} (M) ([3])	Medda ta' Konċ. tat-Test (M)	Valur tal-VM7Luc EC_{50} (M) ([4])	L-Ogħla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) ([5])		
21	Ketokonażol	65277-42-1	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Kompost Eteroċikliku	Farmaċewtiku
22	Reserpina	50-55-5	NEG	—	—	$10^{-11} - 10^{-5}$	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Kompost Eteroċikliku Indol	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; EC_{50} = konċentrazzjoni effettiva medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negatttivi; POŻ = pożittivi; PC_{10} (u PC_{50}) = il-konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li fiha r-rispons ikun 10 % (jew 50 % għall-PC_{50}) tar-rispons indott mill-kontroll pożittiv (E2, 1nM) f'kull pjastra.

([1]) Klassifikazzjoni bħala pożittiv jew negattiv għal attività agonista tal-ER kienet ibbażata fuq id-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbit tal-ER u AT (31) kif ukoll fuq *data* empirika u informazzjoni oħra miksuba minn studji ta' riferiment ppubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM. (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Valuri rrapportati fl-Abbozz tar-Rapport ta' Prevalidazzjoni u Validazzjoni Interlaboratorji għall-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali (TA) Transfettata biex tiġi Individwata Attività Estroġenika - L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Medjat tar-Reċettur Alfa tal-Estroġenu Uman Bl-Użu tal-Linja Ċelolari hER-HeLa-9903 (30).

([3]) Il-valuri medji tal-EC_{50} ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

([4]) Konċentrazzjonijiet rapportati kienu l-ogħla konċentrazzjonijiet ittestjati (sejbien tal-medda) matul il-validazzjoni tal-Assaġġ TA tal-ER VM7Luc. Jekk il-konċentrazzjonijiet varjaw bejn il-laboratorji, tiġi rrapportata l-ogħla konċentrazzjoni. Ara t-tabella 4-10 tar-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM; Il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-Cell®ER (TA tal-ER VM7Luc): Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3).

([5]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bażi ta' *Data* tas-Sustanzi Perikoluži tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) Mit-Tabella 1 (Lista ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (22) għall-Evalwazzjoni tal-Akkuratezza tal-Agonisti tal-ER) tal-Istandards tal-Prestazzjoni (6)

([8]) Jekk sustanza ta' proficjenza ma għadhiex kummerċjalment disponibbli, tista' tintuża sustanza bl-istess klassifikazzjoni u b'potenza, b'modalità ta' azzjoni u bi klassi kimika komparabbli.

Tabella 4

Lista ta' (10) Sustanzi ta' Proficjenza għall-assaġġ tal-antagonisti

	Sustanza [a]	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER [1]			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc [2]			Effetti tal-Kandidat tal-STTA tal-ER [1]	ICCVAM [5] Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH [6] Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott [7]
			Attività TA tal-ER	IC_{50} (M)	Medda ta' Konċ. tat-test (M)	Attività TA tal-ER	IC_{50} [3] (M)	L-Ogħla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) [4]				
1	4-idrossitamossifen	68047-06-3	POŻ	$3{,}97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POŻ	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	POŻ moderati	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
2	Ralossifen HCl	82640-04-8	POŻ	$7{,}86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} – 10^{-7}$	POŻ	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	POŻ moderati	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
3	Tamossifen	10540-29-1	POŻ	$4{,}91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} – 10^{-5}$	POŻ	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POŻ	POŻ	Idrokarbur (Ċikliku)	Farmaċewtiku
4	17β-estradjol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Biex ikunu negattivi (*)	NP	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
5	Apiġenin	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Kompost Etero-ċikliku	Kolorant, Prodott Naturali, Intermedjarju Farmaċewtiku
6	Ftalat tad-di-n-butil	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, Aċidu Ftaliku	Ingredjent Kożmetiku, Sustanza Kimika Industrijali, Plastifikant

	Sustanza ([a])	CASRN	Assaġġ STTA tal-ER ([1])			Assaġġ TA tal-ER VM7Luc ([2])			Effetti tal-Kandidat tal-STTA tal-ER ([1])	ICCVAM ([5]) Klassifikazzjoni tal-Kunsens	MeSH ([6]) Klassi Kimika	Klassi tal-Prodott ([7])
			Attività TA tal-ER	IC_{50} (M)	Medda ta' Konċ. tat-test (M)	Attività TA tal-ER	IC_{50} ([3]) (M)	L-Ogħla Konċ. għas-Sejbien tal-Medda (M) ([4])				
7	Flavon	525-82-6	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	Biex ikunu negattivi (*)	NP	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
8	Ġenisteina	446-72-0	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Biex ikunu negattivi (*)	NEG	Flavonojde, Kompost Eletroċikliku	Prodott Naturali, Farmaċewtiku
9	p-n-nonilfenol	104-40-5	NEG	—	$10^{-9} – 10^{-4}$	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	mhux ittestjat	NEG	Fenol	Intermedjarju Kimiku
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	$10^{-8} – 10^{-3}$	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	Biex ikunu negattivi (*)	NEG	Idrokarbur (Ċikliku)	Prodott Naturali

Abbrevjazzjonijiet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; M = molari; IC_{50} = konċentrazzjoni inibitorja medjana tas-sustanza tat-test; NEG = negatttivi; NP = negattivi prežunti; POŻ = pożittivi.

(*) klassifikati negattivi skont ir-rieżami tad-dokumentazzjoni (2).

([a]) Sustanzi komuni ttestjati fl-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc li ġew nominati antagonisti tal-ER jew negattivi u jintużaw biex tiġi evalwata l-akkuratezza fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (2) (3).

([1]) Ir-Rapport ta' Validazzjoni tal-Assaġġ ta' Attivazzjoni Traskrizzjonali transfettata b'Mod Stabbli biex tiġi Individwata Attività medjata mill-ER, Parti B (2)

([2]) Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar ICCVAM dwar il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-CELL ER (TA tal-ER VM7Luc): Metodu *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Agonisti u tal-Antagonisti tal-ER (3).

([3]) Il-valuri medji tal-EC_{50} ġew ikkalkolati bil-valuri rapportati mil-laboratorji tal-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (XDS, ECVAM u Hiyoshi) (3).

([4]) Konċentrazzjonijiet rapportati kienu l-ogħla konċentrazzjonijiet ittestjati (sejbien tal-medda) matul il-validazzjoni tal-Assaġġ TA tal-ER VM7Luc. Jekk il-konċentrazzjonijiet varjaw bejn il-laboratorji, tiġi rrapportata l-ogħla konċentrazzjoni. Ara t-tabella 4-11 tar-Rapport ta' Evalwazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar tal-ICCVAM; Il-Metodu ta' Ttestjar LUMI-Cell®ER (TA tal-ER VM7Luc): Assaġġ *In Vitro* għall-Identifikazzjoni tal-Attività Agonista u Antagonista tar-Riċettur tal-Estroġenu Uman tas-Sustanzi Kimiċi (3).

([5]) Klassifikazzjoni bħala antagonist tal-ER jew negattivi kienet ibbażata fuq informazzjoni fid-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-metodi ta' ttestjar tal-Irbit tal-ER u tat-TA (31) kif ukoll fuq informazzjoni miksuba minn pubblikazzjonijiet ippubblikati u rieżaminati wara t-tlestija tal-BRDs tal-ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bank ta' *Data* tas-Sustanzi Perikolużi tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

Kriterji ta' Aċċettabbiltà tas-Sessjoni tat-Test

16. Aċċettazzjoni jew rifjut ta' sessjoni tat-test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni tar-riżultati miksuba għall-istandards referenzjarji u għall-kontrolli użati għal kull esperiment. Il-valuri għall-PC_{50} (EC_{50}) jew għall-IC_{50} għall-istandards referenzjarji għandhom jissodisfawi l-kriterji ta' aċċettabbiltà kif previst għall-assaġġ magħżul (għall-STTA ara l-Appendiċi 2, għat-TA tal-ER VM7Luc ara l-Appendiċi 3), u l-kontrolli pożittivi/negattivi kollha għandhom ikunu klassifikati kif suppost għal kull esperiment aċċettat. Il-ħila ta' twettiq tal-assaġġ b'konsistenza għandha tintwera bl-iżvilupp u biż-żamma ta' bażi ta' *data* storika għall-istandards u għall-kontrolli referenzjarji (ara l-paragrafu 15). Id-devjazzjonijiet standard (SD) jew il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni (CV) għall-parametri ta' dħul tal-kurva tal-istandards referenzjarji minn diversi esperimenti jistgħu jintużaw bħala kejl tar-riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju. Barra minn hekk, għandhom jiġu rispettati l-prinċipji li ġejjin rigward il-kriterji ta' aċċettabbiltà:

— Id-*data* għandha tkun biżżejjed għal valutazzjoni kwantitattiva tal-attivazzjoni tal-ER (għall-assaġġ tal-agonisti) jew għat-trażżin tal-ER (għall-assaġġ tal-antagonisti) (jiġifieri l-effikaċja u l-potenza).

— L-attività indikatur medja għall-konċentrazzjoni ta' riferiment tal-estroġenu ta' riferiment għandha tkun tal-anqas il-minimu speċifikat fl-assaġġi fir-rigward ta' dak il-kontroll bil-veikolu (solvent) biex tiġi żgurata sensittività adegwata. Għall-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc, din hi erba' darbiet dik tal-kontroll bil-veikolu medju f'kull pjastra.

— Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom jibqgħu fi ħdan il-medda ta' solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test u ma jurux ċitotossiċità.

Analiżi tad-*data*

17. Il-proċedura definita ta' interpretazzjoni tad-*data* għal kull assaġġ għandha tintuża għall-klassifikazzjoni ta' rispons pożittiv u negattiv.

18. L-ilħuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà (il-paragrafu 16) jindika li l-assaġġ qed jopera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni tat-test partikolari tipproduċi *data* preċiża. Ir-replikar tar-riżultati tal-ewwel sessjoni hu l-aħjar indikazzjoni li tkun ġiet prodotta *data* preċiża. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati riproduċibbli (eż. ir-riżultati taż-żewġ sessjonijiet ta' test jindikaw li sustanza kimika tat-test hi pożittiva), ma hemmx bżonn li ssir it-tielet sessjoni.

19. Jekk żewġ sessjonijiet ma jagħtux riżultati riproduċibbli (eż. sustanza kimika tat-test tkun pożittiva f'sessjoni minnhom u negattiva fis-sessjoni l-oħra), jew jekk ikun meħtieġ grad ogħla ta' ċertezza rigward l-eżitu ta' dan l-assaġġ, tal-anqas għandhom isiru tliet sessjonijiet indipendenti. F'dan il-każ, il-klassifikazzjoni hi bbażata fuq iż-żewġ riżultati konkordanti mit-tlieta.

Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data* Ġenerali

20. Bħalissa ma hemm ebda metodu miftiehem f'livell universali għall-interpretazzjoni tad-*data* tat-TA tal-ER. Madankollu, kemm il-valutazzjonijiet kwalitattivi (eż. pożittivi/negattivi) u/jew kwantitattivi (eż. EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) tal-attività medjata bl-ER għandhom ikunu bbażati fuq *data* empirika u ġudizzju xjentifiku solidu. Fejn possibbli, ir-riżultati pożittivi għandhom ikunu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett meta mqabbel mal-kontroll bil-veikolu (solvent) jew mal-estroġen ta' riferiment kif ukoll mill-konċentrazzjoni li fiha jseħħ l-effett (eż. EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50}, eċċ.).

Rapport tat-Test

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

Assaġġ:

— l-assaġġ użat;

— il-kontroll/l-istandard referenzjarju/is-sustanza kimika tat-test;

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solvent/Veikolu:

— il-karatterizzazzjoni (natura, fornitur u lott);

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin.

Ċelloli:

— it-tip u s-sors taċ-ċelloli:

  • L-ER hu espress b'mod endoġenu? Jekk le, liema riċettur(i) ġie/ġew transfettat(i)?

  • Il-binja/binjiet indikatur(i) użata/i (inklużi l-ispeċijiet sors);

  • Il-metodu ta' transfezzjoni;

  • Il-metodu tal-għażla għaż-żamma ta' transfezzjoni stabbli (fejn applikabbli);

  • Il-metodu ta' transfezzjoni hu rilevanti għal linji stabbli?

— in-numru ta' passaġġi taċ-ċelloli (mit-taħlil);

— in-numru ta' passaġġi taċ-ċelloli fit-taħlil;

— il-metodi għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— limitazzjonijiet tas-solubbiltà;

— deskrizzjoni tal-metodi ta' valutazzjoni tal-vijabbiltà applikati;

— komposizzjoni tal-media, konċentrazzjoni tas-CO_2;

— konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— volum tal-veikolu u tas-sustanza kimika tat-test miżjuda;

— it-temperatura tal-inkubazzjoni u l-umdità;

— id-durata tat-trattament;

— id-densità fil-bidu tat-trattament u matulu;

— standards referenzjarji pożittivi u negattivi;

— reaġenti indikaturi (isem tal-prodott, fornitur u lott);

— kriterji biex is-sessjonijiet ta' testijiet jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Kontroll tal-aċċettabbiltà:

— l-induzzjonijiet tad-drabi għal kull pjastra tal-assaġġ u jekk dawn jissodisfawx il-minimu meħtieġ mill-assaġġ fuq il-bażi tal-kontrolli storiċi;

— il-valuri propji għall-kriterji ta' aċċettabbiltà, eż. $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ u l-valuri Hillslope, għal kontrolli pożittivi konkorrenti/standards referenzjarji.

Ir-riżultati:

— *data* mhux proċessata u normalizzata;

— il-livell massimu ta' induzzjoni tad-drabi;

— *data* dwar iċ-ċitotossiċità;

— jekk teżisti, l-anqas konċentrazzjoni effettiva (LEC);

— il-valuri RPC_{Max}, PC_{Max}, PC_{50}, IC_{50} u/jew EC_{50}, kif ikun xieraq;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— analiżijiet statistiċi, jekk jeżistu, flimkien ma' kejl tal-errur u tal-kunfidenza (eż. SEM, SD, CV jew 95 % CI) u deskrizzjoni ta' kif inkisbu dawn il-valuri.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. u Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. u Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol.* Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol.* Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. u Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. u Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al*. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al*. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al*. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al*. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al*. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al*. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al*. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. u Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET U ABBREVJAZZJONIJIET

Kriterji ta' aċċettabbiltà: L-istandards minimi għat-twettiq tal-kontrolli sperimentali u l-istandards referenzjarji. Il-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha għandhom jiġu ssodisfati biex esperiment jitqies validu.

Akkuratezza (konkordanza): Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-assaġġ u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-assaġġ u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' assaġġ (20).

Agonist: Sustanza li tipproduċi rispons, eż. traskrizzjoni, meta tillega ma' reċettur speċifiku.

Antagonist: Tip ta' ligand ta' reċettur jew ta' sustanza kimika li ma jipprovkax rispons bijoloġiku hu stess meta jillega ma' reċettur, iżda jimblokka jew itaffi risponsi medjati minn agonist.

Attività antiestroġenika: il-kapaċità ta' sustanza kimika li trażżan l-azzjoni ta' 17β-estradjol medjata permezz tar-riċetturi tal-estroġenu.

Morfoloġija taċ-ċelloli: Il-forma u d-dehra ta' ċelloli mkabbra f'monosaff fi bwejra waħda ta' pjastra tal-koltura tat-tessuti. Ċelloli li jkunu qed jinxfu spiss juru morfoloġija anormali taċ-ċelloli.

CF: Il-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Evalwazzjoni tal-Interferenti Endorkinali.

Trattament bil-faħam/bid-dekstran: Trattament ta' serum użat f'koltura taċ-ċelloli. Trattament bil-faħam/bid-dekstran (spiss imsejjaħ "strippaġġ") ineħħi l-ormoni endoġeni u l-proteini li jillegaw mal-ormoni.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Ċitotossiċità: Effetti dannużi fl-istruttura jew fil-funzjoni ċellolari li finalment jistgħu jikkawżaw mewt taċ-ċelloli u jistgħu jkunu riflessi bi tnaqqis fin-numru ta' ċelloli preżenti fil-bwejra fi tmiem il-perjodu ta' esponiment jew tnaqqis fil-kapaċità għal kejl ta' funzjoni ċellolari meta mqabbla mal-kontroll b'veikolu konkorrenti.

CV: Koeffiċjent ta' varjazzjoni

DCC-FBS: Serum bovin fetali trattat bil-faħam miksi bid-dekstran.

DMEM: Modifika ta' Dulbecco tal-Medium ta' Eagle

DMSO: Sulfossidu tad-dimetil

E2: 17β-estradjol

EC50: Il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test.

ED: Interferenza endokrinali

hERα: Riċettur alfa tal-estroġenu uman

hERß: Riċettur beta tal-estroġenu uman

EFM: Medium ħieles mill-estroġenu. Il-Modifika ta' Dulbecco tal-Medium ta' Eagle (DMEM) supplimentat b'4,5 % FBS trattat bil-faħam/bid-dekstran, 1,9 % L-glutammina, u 0,9 % Pen-Strep.

ER: Riċettur tal-Estroġenu

ERE: Element ta' rispons tal-estroġenu

Attività estroġenika: Il-kapaċità ta' sustanza kimika li timita 17β-estradjol fil-ħila tiegħu li jillega ma' riċetturi tal-estroġenu u jattivahom. L-attività estroġenika medjata minn hERα tista' tiġi individwata b'dan il-metodu ta' ttestjar.

ERTA: Trans Attivazzjoni tar-Riċettur tal-Estroġenu

FBS: Serum bovin fetali

HeLa: Linja ta' ċelloli ċervikali umana immortali

HeLa9903: Subklon taċ-ċellola HeLa li fih hERααu ġene indikatur tal-luċiferaži jkunu ġew transfettati b'mod stabbli

IC_{50}: Il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test inibitorja.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl ta' kemm laboraotrji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi, jistgħu jipproduċu riżultati kwalitattivament u kwantitattivament simili. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hi determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm assaġġ jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (1).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jistgħu jirreplikaw b'suċċess ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku f'ħinijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll "riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju" (1).

LEC: L-anqas konċentrazzjoni effettiva hi l-anqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li tipproduċi rispons (jiġifieri l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha l-induzzjoni tad-drabi tkun statistikament differenti mill-kontroll bil-veikolu konkorrenti).

Test me-too: Espressjoni kollokwjali għal assaġġ li jkun strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat u aċċettat. Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili.

MT: Metallotjonein

MMTV: Vajrus tat-Tumur Mammarju fil-Ġrieden

OHT: 4-Idrossitamossifen

PBTG: Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni

PC (Kontroll pożittiv): sustanza attiva ħafna, idealment 17ß-estradjol, li tkun inkluża fit-testijiet kollha biex tgħin fl-iżgurar ta' funzjonament xieraq tal-assaġġ.

PC_{10}: il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha l-attività mkejla f'assaġġ agonist tkun 10 % tal-attività massima indotta mill-PC (E2 1'fnM għall-assaġġ STTA) f'kull pjastra.

PC_{50}: il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha l-attività mkejla f'assaġġ agonist tkun 50 % tal-attività massima indotta mill-PC (E2 fil-konċentrazzjoni ta' riferiment speċifikata fil-metodu ta' ttestjar) f'kull pjastra.

PC_{Max}: il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi l-RPCMax

Standards tal-prestazzjoni: Standards, ibbażati fuq assaġġ validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' assaġġ propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inkluži hemm (1) il-komponenti essenzjali tal-assaġġ; (2) lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (3) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-assaġġ validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (1).

Sustanzi ta' proficjenza: Subsett tas-sustanzi ta' riferiment inkluži fl-Istandards tal-Prestazzjoni li jistgħu jintużaw mil-laboratorji biex tintwera kompetenza teknika b'metodu ta' ttestjar standardizzat. Il-kriterji tal-għażla għal dawn is-sustanzi tipikament jinkludu li dawk jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi, ikunu kummerċjalment disponibbli, u jkollhom *data* ta' riferiment ta' kwalità għolja disponibbli.

Proficjenza: Il-ħila murija biex jitwettaq assaġġ kif suppost qabel l-ittestjar ta' sustanza mhux magħrufa.

Estroġenu ta' riferiment (Kontroll pożittiv, PC): 17β-estradjol (E2, CAS 50-28-2).

Standard ta' riferiment: sustanza ta' riferiment użata biex tintwera l-adegwatezza ta' assaġġ. 17β-estradjol hu l-istandard referenzjarju għall-assaġġi STTA u TA tal-ER VM7Luc.

Metodi ta' ttestjar ta' riferiment: L-assaġġi li fuqhom hi bbażata PBTG 455.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni ta' assaġġ mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm l-assaġġ għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' assaġġ (1).

Affidabbiltà: Kejl ta' kemm assaġġ jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduttività ta' fost u bejn il-laboratorji.

RLU: Unitajiet tad-Dawl Relattivi

RNA: Aċidu Ribonuklejku

RPC_{Max}: il-livell massimu ta' rispons indott minn sustanza kimika tat-test, espress bħala perċentwal tar-rispons indott minn
1 nM E2 fuq l-istess pjastra

RPMI: Medium RPMI 1 640 supplimentat b'0,9 % Pen-Strep u 8,0 % serum bovin fetali (FBS)

Sessjoni: Esperiment individwali li jevalwa l-azzjoni kimika fuq l-eżitu bijoloġiku tal-assaġġ. Kull sessjoni tkun esperiment komplut fuq bwejriet repliki ta' ċelloli pjastrati minn raggruppament komuni ta' ċelloli fl-istess ħin.

Sessjoni indipendenti: Esperiment separat, indipendenti li jevalwa l-azzjoni kiika fuq l-eżitu bijoloġiku tal-assaġġ, bl-użu ta' ċelloli minn raggruppament differenti, sustanzi kimiċi dilwiti friski, imwettaq f'jiem differenti jew fl-istess jum minn persunal differenti.

SD: Devjazzjoni standard.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-assaġġ. Hi kejl tal-preċiżjoni għal assaġġ li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' assaġġ (1).

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal assaġġ li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' assaġġ (1).

Transfezzjoni stabbli: Meta d-DNA jiġi transfettat f'ċelloli kolturati b'tali mod li jiġi integrat b'mod stabbli fil-ġenoma taċ-ċelloli, li jirriżulta fl-espressjoni stabbli ta' ġeni transfettati. Kloni ta' ċelloli transfettati stabbiliment jintgħażlu minn markaturi stabbli (eż. reżistenza għall-G418).

Assaġġ STTA: Assaġġ ta' Transattivazzjoni Transfettata b'Mod Stabbli, l-assaġġ ta' attivazzjoni traskrizzjonali tal-ERα li juża l-Linja ta' Ċelloli HeLa 9 903.

Studju: Il-medda sħiħa ta' ħidma sperimentali mwettqa biex tiġi evalwata sustanza waħda speċifika bl-użu ta' assaġġ speċifiku. Studju jinkludi l-istadji kollha inklużi t-testijiet ta' dilwizzjoni tas-sustanza tat-test fil-media tat-test, sessjonijiet preliminari ta' sejbien tal-medda, is-sessjonijiet komprensivi neċessarji kollha, l-analiżijiet tad-*data*, l-assigurazzjoni tal-kwalità, il-valutazzjonijiet taċ-ċitotossiċità, eċċ. It-tlestija ta' studju tippermetti l-klassifikazzjoni tal-attività tas-sustanza kimika tat-test fuq il-mira ta' tossiċità (jiġifieri attiva, inattiva jew inkonklużiva) li tkun evalwata mill-assaġġ użat u stima tal-potenza relattiva għas-sustanza kimika ta' riferiment pożittiva.

Sustanza: Skont REACH [1], sustanza hi definita bħala element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' manifattura, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha. Tintuża definizzjoni simili ħafna fil-kuntest tal-GHS tan-NU (1).

TA (Transattivazzjoni): It-tnedija tas-sinteżi tal-mRNA bħala rispons għal sinjal kimiku speċifiku, bħal irbit ta' estroġenu mar-riċettur tal-estroġenu

Assaġġ: Fi ħdan il-kuntest ta' dan il-metodu ta' ttestjar, assaġġ hu waħda mill-metodoloġiji bħala validi fl-issodisfar tal-kriterji ta' prestazzjoni spjegati. Il-komponenti tal-assaġġ jinkludu, pereżempju, il-linja ta' ċelloli speċifika bil-kundizzjonijiet ta' tkabbir assoċjati, il-media speċifiċi li fihom jitwettaq it-test, il-kundizzjonijiet tal-kompożizzjoni tal-pjastri, l-arranġament u d-dilwizzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test flimkien ma' kwalunkwe miżura ta' kontroll tal-kwalità meħtieġa oħra u l-istadji ta' evalwazzjoni tad-*data* assoċjati.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Traskrizzjoni: Sinteżi tal-mRNA

UVCB: Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti jew Materjali Bijoloġiċi b'Reazzjoni Kumplessa

Metodu ta' ttestjar validat: Assaġġ li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex tiġi determinata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabli għall-għan propost (1).

Validazzjoni: Il-proċess li bih l-affidabbiltà u r-rilevanza ta' approċċ, ta' metodu, ta' assaġġ, ta' proċess jew ta' valutazzjoni partikolari jkunu stabbiliti għal għan definit (1).

VC (Kontroll bil-veikolu): Is-solvent li jintuża biex jiġu dissolti s-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll jiġi ttestjat unikament bħala veikolu mingħajr sustanza kimika dissolta.

VM7: Ċellola tal-adenokarċinoma immortalizzata li tesprimi b'mod endoġenu r-riċettur tal-estroġenu.

VM7Luc4E2: Il-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2 ġiet derivata miċ-ċelloli tal-adenokarċinoma immortalizzati derivati mill-bniedem VM7 li jesprimu b'mod endoġenu ż-żewġ forom tar-riċettur tal-estroġenu (ERα u ERβ) u ġew transfettati b'mod stabbli bil-plażmid pGudLuc7.ERE. Dan il-plażmid fih erba' kopji ta' oligonukleotid sintetiku li fih l-element ta' rispons tal-estroġenu upstream mill-promotur virali tat-tumur mammarju fil-ġrieden (MMTV) u l-ġene tal-luċiferaži tal-firefly.

Kontroll pożittiv dgħajjef: Sustanza attiva b'mod dgħajjef magħżula mil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment li tkun inkluża fit-testijiet kollha biex tgħin fl-iżgurar ta' funzjonament xieraq tal-assaġġ.

[1] Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni (ĠU L 304, 22.11.2007, p. 1).

Appendiċi 2

ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RIĊETTUR-A TAL-ESTROĠENU UMAN TRANSFETTAT B'MOD STABBLI GĦAD-DETEZZJONI TA' ATTIVITÀ AGONISTA U ANTAGONISTA TA' SUSTANZI KIMIĊI BL-UŻU TAL-LINJA TA' ĊELLOLI HERA-HELA-9903

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. Dan l-assaġġ tat-transattivazzjoni (TA) juża l-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903 biex jindividwa attività agonista estroġenika medjata permezz tar-riċettur alfa tal-estroġenu uman (hERα). L-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ ta' Transattivazzjoni Transfettata b'Mod Stabbli (STTA) mill-Japanese Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI) bl-użu tal-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903 għad-detezzjoni ta' attività agonista u antagonista estroġenika medjata permezz tar-riċettur alfa tal-estroġenu uman (hERα) wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ għall-għan maħsub tiegħu (1).

2. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa TA medjata minn hERα billi jkejjel il-kemiluminexxenza bħala l-punt ta' tmiem. Madankollu, sinjali ta' luminexxenza medjata mhux minn riċettur ġew rapportati f'konċentrazzjonijiet ta' fitoestroġenu ogħla minn 1 μM minħabba l-attivazzjoni eċċessiva tal-ġene indikatur tal-luċiferaži (2) (3). Filwaqt li l-kurva ta' doża - rispons tindika li l-attivazzjoni vera tas-sistema tal-ER isseħħ f'konċentrazzjonijiet inferjuri, l-espressjoni tal-luċiferaži miksuba f'konċentrazzjonijiet ogħla ta' fitoestroġeni jew ta' komposti simili suspettati li jipproduċu attivazzjoni eċċessiva simili għal fitoestroġenu tal-ġene indikatur tal-luċiferaži trid tiġi eżaminata bir-reqqa f'sistemi tal-assaġġ TA tal-ER transfettati b'mod stabbli (Appendiċi 1).

3. Għandhom jinqraw it-taqsimiet "INTRODUZZJONI ĠENERALI" u "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 2.1.

PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

4. L-assaġġ jintuża biex jissenjala rbit tar-riċettur tal-estroġenu ma' ligand. Wara l-irbit mal-ligand, il-kumpless riċettur-ligand jittrażloka għan-nukleu fejn hu jillega elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva ġene indikatur tal-luċiferaži tal-firefly, li jirriżulta f'espressjoni ċellolari miżjuda tal-enzima luċiferaži. Il-luċiferin hu substrat li jiġi trasformat mill-enzima luċiferaži fi prodott tal-bijoluminexxenza li jista' jitkejjel b'mod kwantitattiv b'luminometru. L-attività tal-luċiferaži tista' tiġi evalwata malajr u mingħajr ma jintefqu wisq flus b'numru ta' kits tat-test disponibbli kummerċjalment.

5. Is-sistema tat-test tuża l-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903, li hi derivata minn tumur ċervikali uman, b'żewġ binjiet imdaħħla b'mod stabbli: (i) il-binja tal-espressjoni tal-hERαα(li tikkodifika r-riċettur uman b'tul sħiħ), u (ii) binja indikatur tal-luċiferaži tal-firefly li ġġarrab ħames ripetizzjonijiet tandem ta' Element Risponsiv għall-Estroġenu (ERE) tal-vitelloġenin xprunat minn element TATA promotur tal-metallotjonein (MT) tal-ġrieden. Intwera li l-binja tal-ġene TATA MT tal-ġrieden għandha l-aħjar prestazzjoni, u b'hekk tintuża ta' spiss. Konsegwentement, din il-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903 tista' tkejjel il-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi transattivazzjoni medjata tal-hERα tal-espressjoni ġenika tal-luċiferaži.

6. Fil-każ ta' assaġġ tal-agonisti tal-ER, l-interpretazzjoni tad-*data* hi bbażata fuq jekk il-livell ta' rispons massimu indott minn sustanza kimika tat-test jilħaqx jew jaqbiżx rispons tal-agonist ekwivalenti għal 10 % ta' dak indott minn konċentrazzjoni li tinduċi massimalment (1 nM) tal-kontroll pożittiv (PC) 17β-estradjol (E2) (jiġifieri l-PC10). Fil-każ tal-assaġġ tal-antagonisti tal-ER, l-interpretazzjoni tad-*data* hi bbażata fuq jekk ir-rispons jurix tal-anqas tnaqqis ta' 30 % fl-attività mir-rispons indott miż-żieda fil-kontroll (25 pM tal-E2) mingħajr ċitotossiċità. L-analiżi u l-interpretazzjoni tad-*data* huma diskussi fid-dettall fil-paragrafi 34 - 48.

PROĊEDURA

Linja ta' Ċelloli

7. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli hERα-HeLa-9 903 għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli tista' tinkiseb mill-Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank ([1]), wara li jiġi ffirmat Ftehim ta' Trasferiment tal-Materjal (MTA).

8. Fl-ittestjar għandhom jintużaw biss ċelloli karatterizzati bħala ħielsa minn mikoplażma. RT-PCR (Reazzjoni Katina bil-Polimeraži f'Ħin Reali) hi l-metodu tal-għażla għal detezzjoni sensittiva ta' infezzjoni tal-mikoplażma (4) (5) (6).

Stabbiltà tal-linja ta' ċelloli

9. Biex tiġi ssorveljata l-istabbiltà ta' linja ta' ċelloli, E2, 7α-estradjol, 17α-metiltestosterone u kortikosteron għandhom jintużaw bħala l-istandards referenzjarji għall-assaġġ tal-agonisti u kurva sħiħa konċentrazzjoni rispons fil-medda tal-konċentrazzjoni tat-test ipprovduta fit-Tabella 1 għandha titkejjel tal-anqas darba kull darba li jsir l-assaġġ, u r-riżultati għandhom ikunu jaqblu mar-riżultati pprovduti fit-Tabella 1.

10. Fil-każ ta' assaġġ tal-antagonisti, kurvi ta' konċentrazzjoni sħaħ għal żewġ standards referenzjarji, tamossifen u flutammid, għandhom jitkejlu b'mod simultanju ma' kull sessjoni. Il-klassifikazzjoni kwalitattiva korretta bħala pożittiva jew negattiva għaż-żewġ sustanzi kimiċi għandha tiġi ssorveljata.

Koltura taċ-Ċelloli u Kundizzjonijiet tal-Pjastrament

11. Iċ-ċelloli għandhom jinżammu f'Medium Essenzjali Minimu ta' Eagle (EMEM) mingħajr fenol aħmar, supplimentati b'60 mg/l ta' kanamiċina antibijotika u 10 % serum bovin fetali trattat bil-faħam miksi bid-dekstran (DCC-FBS), f'inkubatur tas-CO2 (5 % CO2) f'37±1°C. Malli jilħqu konfluwenza ta' 75-90 %, iċ-ċelloli jistgħu jiġu subkolturati f'10 ml ta' 0,4 x 105 – 1 x 105 ċelloli/ml għal platt tal-koltura taċ-ċelloli ta' 100 mm. Iċ-ċelloli għandhom jiġu sospiżi b'10 % FBS-EMEM (li hu l-istess bħall-EMEM b'DCC-FBS) u mbagħad jiġu pjastrati fi bwejriet ta' mikropjastra f'densità ta' 1 x 104 ċelloli/(100 µl x bwejra). Imbagħad, iċ-ċelloli għandhom jiġu preinkubati f'inkubatur tas-CO2 ta' 5 % f'37°±1°C għal tliet sigħat qabel l-esponiment għas-sustanza kimika. L-oġġetti tal-plastik għandhom ikunu ħielsa minn attività estroġenika.

12. Biex tinżamm l-integrità tar-rispons, iċ-ċelloli għandhom jitkabbru għal aktar minn passaġġ wieħed mill-istokk friżat fil-media kundizzjonata u ma għandhomx jiġu kolturati għal aktar minn 40 passaġġ. Għal-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903, dan ikun anqas minn tliet xhur. Madankollu, il-prestazzjoni taċ-ċelloli tista' tonqos jekk jitkabbru f'kundizzjonijiet ta' koltura mhux adatti.

13. Id-DCC-FBS jista' jitħejja kif deskritt fl-Appendiċi 2.2, jew jinkiseb minn sorsi kummerċjali.

Kriterji ta' aċċettabbiltà

Standards ta' referenza pożittivi u negattivi għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER

14. Qabel u matul l-istudju, ir-risponsività tas-sistema tat-test għandha tiġi verifikata bl-użu tal-konċentrazzjonijiet xierqa ta' estroġenu b'saħħtu: E2, estroġenu dgħajjef (17α-estradjol), agonist dgħajjef ħafna (17α-metiltestosteron), u sustanza negattiva (kortikosteron). Il-valuri tal-medda aċċettabbli miksuba mill-istudju ta' validazzjoni (1) jingħataw fit-Tabella 1. Dawn l-erba' standards referenzjarji konkorrenti għandhom ikunu inklużi ma' kull esperiment u r-riżultati għandhom jaqgħu fi ħdan il-limiti aċċettabbli mogħtija. Jekk dan ma jkunx il-każ, il-kawża għan-nuqqas ta' ssodisfar tal-kriterji ta' aċċettabbiltà għandha tkun determinata (eż. immaniġġjar taċ-ċelloli, u serum u antibijotiċi għall-kwalità u għall-konċentrazzjoni) u l-assaġġ għandu jerġa' jsir. Ladarba jintlaħqu l-kriterji ta' aċċettabbiltà, biex tiġi żgurata

([1]) JCRB Cell Bank : National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Fax: +81-72-641-9812

varjabbiltà minima tal-valuri tal-EC_{50}, tal-PC_{50} u tal-PC_{10}, hu essenzjali li jsir użu konsistenti mill-materjali għall-kolturar taċ-ċelloli. L-erba' standards referenzjarji konkorrenti, li għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment (imwettqa fl-istess kundizzjonijiet inklużi l-materjali, il-livell tal-passaġġi taċ-ċelloli u t-tekniċi), jistgħu jiżguraw is-sensittività tal-assaġġ għaliex il-PC_{10}s tat-tliet standards referenzjarji pożittivi għandhom jaqgħu fi ħdan il-medda aċċettabbli, u hekk ukoll il-PC_{50}s u l-EC_{50}s fejn jistgħu jiġu kkalkolati (ara t-Tabella 1).

Tabella 1

Il-valuri tal-medda aċċettabbli tal-erba standards referenzjarji għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER

Isem	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Pendil ta' Hill	Medda tat-test
17β-estradjol (E2) Nru CAS: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-estradjol Nru CAS: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikosteron Nru CAS: 50-22-6	–	–	–	–	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metiltestosteron Nru CAS: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	–	–	10^{-11}~10^{-5}M

Standards ta' referenza pożittivi u negattivi għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

15. Qabel u matul l-istudju, ir-risponsività tas-sistema tat-test għandha tiġi verifikata bl-użu tal-konċentrazzjonijiet xierqa ta' sustanza pożittiva (Tamossifen), u ta' sustanza negattiva (Flutammid). Il-valuri tal-medda aċċettabbli miksuba mill-istudju ta' validazzjoni (1) jingħataw fit-Tabella 2. Dawn iż-żewġ standards referenzjarji konkorrenti għandhom ikunu inklużi ma' kull esperiment u r-riżultati għandhom jiġu ġġudikati bħala korretti kif muri fil-kriterji. Jekk dan ma jkunx il-każ, il-kawża għan-nuqqas ta' ssodisfar tal-kriterji għandhom ikunu determinati (eż. immaniġġjar taċ-ċelloli, u serum u antibijotiċi għall-kwalità u għall-konċentrazzjoni) u l-assaġġ għandu jerġa' jsir. Barra minn hekk, il-valuri tal-IC_{50} għal sustanza pożittiva (Tamossifen) għandhom jiġu kkalkolati u r-riżultati għandhom jaqgħu fi ħdan il-limiti aċċettabbli mogħtija. Ladarba jintlaħqu l-kriterji ta' aċċettabbiltà, biex tiġi żgurata varjabbiltà minima tal-valuri tal-IC50, hu essenzjali li jsir użu konsistenti mill-materjali għall-kolturar taċ-ċelloli. Iż-żewġ standards referenzjarji konkorrenti, li għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment (imwettaq fl-istess kundizzjonijiet inklużi l-materjali, il-livell tal-passaġġi taċ-ċelloli u tat-tekniċi), jistgħu jiżguraw is-sensittività tal-assaġġ (ara t-Tabella 2).

Tabella 2

Il-kriterji u l-valuri tal-medda aċċettabbli taż-żewġ standards ta' refrenza għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

Isem	Kriterji	$LogIC_{50}$	Medda tat-test
Tamossifen Nru CAS: 10 540-29-1	Pożittiv: IC50 għandu jiġi kkalkolat	-5,942-7,596	10-10-10-5M
Flutammid Nru CAS: 13 311-84-7	Negattiv: IC30 ma għandux jiġi kkalkolat	-	10-10 -10-5M

Kontrolli Pożittivi u Negattivi

16. Il-kontroll pożittiv (PC) għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER (1 nM tal-E2) u għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER (10μM TAM) għandu jiġi ttestjat tal-anqas fi triplikat f'kull pjastra. Il-veikolu li jintuża biex sustanza kimika tat-test tiġi dissolta għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'veikolu (VC) tal-anqas fi triplikat f'kull pjastra. Minbarra dan il-VC, jekk il-PC juża veikolu differenti mis-sustanza kimika tat-test, VC ieħor għandu jiġi ttestjat tal-anqas fi triplikat fuq l-istess pjastra bil-PC.

Kriterji tal-kwalità għall-assaġġ tal-agonisti tal-ER

17. L-attività medja tal-luċiferaži tal-kontroll pożittiv (1 nM E2) tal-anqas għandha tkun erba' darbiet dik tal-VC medju f'kull pjastra. Dan il-kriterju hu stabbilit fuq il-bażi tal-affidabbiltà tal-valuri tal-punt ta' tmiem mill-istudju ta' validazzjoni (storikament bejn erba' darbiet u 30 darba).

18. Fir-rigward tal-kontroll tal-kwalità tal-assaġġ, l-induzzjoni tad-drabi li tikkorrispondi għall-valur tal-PC10 tal-PC konkorrenti (1 nM E2) għandha tkun akbar minn 1+2SD tal-valur tal-induzzjoni tad-drabi (=1) tal-VC konkorrenti. Għall-finijiet ta' prijoritizzazzjoni, il-valur tal-PC10 jista' jkun siewi biex tiġi simplifikata l-analiżi tad-*data* meħtieġa meta mqabbla ma' analiżi statistika. Għalkemm analiżi statistika tipprovdi informazzjoni dwar is-sinifikat, analiżi bħal din mhix parametru kwantitattiv fir-rigward tal-potenzjal ibbażat fuq il-konċentrazzjoni, u għalhekk hi anqas utli għall-finijiet ta' prijoritizzazzjoni.

Kriterji tal-kwalità għall-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

19. L-attività medja tal-luċiferaži taż-żieda fil-kontroll (25 pM E2) tal-anqas għandha tkun erba' darbiet dik tal-VC medju f'kull pjastra. Dan il-kriterju hu stabbilit fuq il-bażi tal-affidabbiltà tal-valuri tal-punt ta' tmiem mill-istudju ta' validazzjoni.

20. Fir-rigward tal-kontroll tal-kwalità tal-assaġġ, l-attivazzjoni traskrizzjonali relattiva (RTA) ta' 1 nM E2 għandha tkun akbar minn 100 %, l-RTA ta' 1 μM 4-Idrossitamossifen (OHT) għandha tkun anqas minn 40,6 % u l-RTA ta' 100 μM Diġitonina (Diġ) għandha tkun anqas minn 0 %.

Wiri tal-Proficjenza tal-Laboratorju (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f'« KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER» **ta'** dan il-metodu ta' ttestjar).

Veikolu

21. Id-dimetil sulfossidu (DMSO), jew solvent xieraq, fl-istess konċentrazzjoni użata għall-kontrolli pożittivi u negattivi differenti u għas-sustanzi kimiċi tat-test għandu jintuża bħala l-VC konkorrenti. Is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti f'solvent li jissolubilizza dik is-sustanza kimika tat-test u li jitħallat mal-medium taċ-ċelloli. L-ilma, l-etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) u d-DMSO huma veikoli xierqa. Jekk jintuża d-DMSO, il-livell ma għandux jaqbeż iż-0,1 % (v/v). Għal kwalunkwe veikolu, għandu jintwera li l-volum massimu użat mhuwiex ċitotossiku u ma jinterferixxix mat-twettiq tal-assaġġ.

Preparazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

22. Ġeneralment, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti fid-DMSO jew f'solvent xieraq ieħor, u jiġu dilwiti serjalment bl-istess solvent fi proporzjon komuni ta' 1:10 biex jitħejjew soluzzjonijiet għad-dilwizzjoni mal-media.

Solubbiltà u Ċitotossiċità: Kunsiderazzjonijiet għas-Sejbien tal-Medda.

23. Għandu jitwettaq test preliminari biex tiġi determinata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa tas-sustanza kimika li tkun se tiġi ttestjata, u biex jiġi żgurat jekk is-sustanza kimika tat-test jistax ikollha xi problemi ta' solubbiltà u ta' ċitotossiċità. Għall-ewwel, is-sustanzi kimiċi jiġu ttestjati sal-konċentrazzjoni massima ta' 1 μl/ml, 1 mg/ml, jew 1 mM, skont liema tkun l-anqas waħda. Fuq il-bażi tal-firxa ta' ċitotossiċità jew tan-nuqqas ta' solubbiltà osservati fit-test preliminari, l-ewwel sessjoni definita għandha tittestja s-sustanza kimika tat-test f'dilwizzjonijiet log-serjali billi tibda bil-konċentrazzjoni aċċettabbli massima (eż. 1 mM, 100μM, 10μM, eċċ.) u tiġi nnotata l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat jew ta' ċitotossiċità. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni, u jekk meħtieġa, fit-tielet sessjoni, għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex jikkaratterizzaw aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons u biex jiġu evitati konċentrazzjonijiet li jinstabu li jkunu insolubbli jew jinduċu ċitotossiċità eċċessiva.

24. Għall-agonisti u għall-antagonisti tal-ER, il-preżenza ta' livelli dejjem akbar ta' ċitotossiċità tista' tbiddel b'mod sinifikanti jew telimina r-rispons sigmojdali tipiku u għandha tiġi kkunsidrata meta tiġi interpretata d-*data*. Għandhom jintużaw metodi ta' ttestjar taċ-ċitotossiċità li jistgħu jipprovdu informazzjoni rigward vijabbiltà ta' 80 % taċ-ċelloli, billi jintuża assaġġ xieraq ibbażat fuq l-esperjenza tal-laboratorju.

25. Jekk ir-riżultati tat-test taċ-ċitotossiċità juru li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test naqqset in-numru ta' ċelloli b'20 % jew aktar, din il-konċentrazzjoni għandha titqies bħala ċitotissika, u l-konċentrazzjonijiet fil-konċentrazzjoni ċitotossika jew ogħla minn din għandhom jiġu eskluži mill-evalwazzjoni.

Esponiment għas-Sustanza Kimika u Organizzazzjoni tal-Pjastra tal-Assaġġ

26. Il-proċedura għad-dilwizzjonijiet kimiċi (Stadji 1 u 2) u għall-esponiment għaċ-ċelloli (Stadju 3) tista' titwettaq kif ġej:

Stadju 1: Kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi dilwita serjalment fid-DMSO, jew f'solvent xieraq, u tiżdied mal-bwejriet ta' pjastra għall-mikrotitraġġ biex jinkisbu konċentrazzjonijiet serjali finali kif determinati mit-test preliminari ta' sejbien tal-medda (tipikament f'serje ta', pereżempju, 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, u 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) għall-ittestjar triplikat.

Stadju 2: Dilwizzjoni kimika: L-ewwel issir dilwizzjoni ta' 1,5 µl tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent sa volum ta' 500 µl tal-media.

Stadju 3: Esponiment kimiku taċ-ċelloli: Jiżdiedu 50 µl tad-dilwizzjoni mal-media (imħejjija fl-Istadju 2) fi bwejra tal-assaġġ li jkun fiha 10^4 ċelloli/100 µl/bwejra.

Il-volum finali rakkomandat tal-media meħtieġ għall kull bwejra hu ta' 150 µl. Il-kampjuni tat-test u l-istandards referenzjarji jistgħu jiġu assenjati kif muri fit-Tabella 3 u fit-Tabella 4.

Tabella 3

Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tal-istandards referenzjarji fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER

Ringiela	17α-metiltestosteron			Kortikosteron			17α-estradjol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konċ 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	konċ 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konċ 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konċ 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konċ 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konċ 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konċ 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO); PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2)

27. L-istandards referenzjarji (E2, 17α-estradjol, 17−μετιλμτεστοστεροντυυκορτικοστερονκκγγανδηομαφιυυττεστφατιαφφκ-υλλκσεσσφονιοοΤαβελλαTTTTTIl-bwejriet tal-PC trattati b'1 nM ta' E2 li jistgħu jipproduċu induzzjoni massima ta' bwejriet ta' E2 u ta' VC bid-DMSO (jew b'solvent xieraq) waħdu għandhom ikunu inklużi f'kull pjastra tal-assaġġ tat-test (Tabella 4). Jekk fl-istess esperiment jintużaw ċelloli minn sorsi differenti (eż. numru ta' passaġġi differenti, lott differenti, eċċ.), l-istandards referenzjarji għandhom jiġu ttestjati għal kull sors ta' ċelloli.

Tabella 4

Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tas-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll tal-pjastra fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER

Ringi-ela	Sustanza Kimika tat-Test 1			Sustanza Kimika tat-Test 2			Sustanza Kimika tat-Test 3			Sustanza Kimika tat-Test 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konċ 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	konċ 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	konċ 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	konċ 4 (10 nM)	→	→	1 μM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	konċ 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	konċ 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	konċ 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO); PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2)

Tabella 5

Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tal-istandards referenzjarji fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

Ringiela	**Tamossifen**			**Flutammid**			**Sustanza Kimika tat-Test 1**			**Sustanza Kimika tat-Test 2**		
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	**konċ 1 (10 μM)**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→	**10 μM**	→	→
B	**konċ 2 (1 μM)**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→	**1 μM**	→	→
C	**konċ 3 (100 nM)**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→	**100 nM**	→	→
D	**konċ 4 (10 nM)**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→	**10 nM**	→	→
E	**konċ 5 (1 nM)**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→	**1 nM**	→	→
F	**konċ 6 (100 pM)**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→	**100 pM**	→	→
G	**0,1 % DMSO**	→	→	→	→	→	**1 μM OHT**	→	→	**100 μM Diġ**	→	→
H	**VC**	→	→	→	→	→	**PC**	→	→	→	→	→

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO), PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2), OHT :4-Idrossitamossifen, Diġ: Diġitonina.

= miżjuda b'25pM E2

28. Biex tiġi evalwata l-attività antagonista tas-sustanzi kimiċi, il-bwejriet tal-assaġġ li jinsabu fir-ringieli minn A sa G għandhom jiżdiedu b'25pM E2. L-istandards referenzjarji (Tamossifen u Flutammid) għandhom jiġu ttestjati f'kull sessjoni. Bwejriet tal-PC trattati b'1 nM tal-E2 li jistgħu jintużaw bħala kontroll tal-kwalità tal-linja ta' ċelloli hERα-HeLa-9 903, bwejriet tal-VC trattati bid-DMSO (jew b'solvent xieraq), bwejriet tad-DMSO ta' 0,1 % trattati b'żieda tad-DMSO mal-E2 miżjud li jikkorrispondu għaż-"Żieda fil-kontroll", bwejriet trattati b'konċentrazzjoni finali ta' 1 µM OHT u bwejriet trattati b'100 µM Diġ għandhom ikunu inklużi f'kull pjastra tal-assaġġ tat-test (Tabella 5). Pjastra tal-assaġġ sussegwenti għandha ssegwi l-istess tifsila tal-pjastra mingħajr bwejriet tal-istandards referenzjarji (Tabella 6). Jekk fl-istess esperiment jintużaw ċelloli minn sorsi differenti (eż. numru ta' passaġġi differenti, lott differenti, eċċ.), l-istandards referenzjarji għandhom jiġu ttestjati għal kull sors ta' ċelloli.

Tabella 6

Eżempju ta' assenjament tal-konċentrazzjoni tal-pjastri tas-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll tal-pjastra fil-pjastra tal-assaġġ fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

Ringiela	Sustanza Kimika tat-Test 1			Sustanza Kimika tat-Test 2			Sustanza Kimika tat-Test 3			Sustanza Kimika tat-Test 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	konċ 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	konċ 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	konċ 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	konċ 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	konċ 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	konċ 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Diġ	→	→
H	VC	→	→	→	→	→	PC	→	→	→	→	→

VC: Kontroll bil-veikolu (0,1 % DMSO), PC: Kontroll pożittiv (1 nM E2), OHT: 4-Idrossitamossifen, Diġ: Diġitonina.

: Miżjuda b'25pM E2

29. In-nuqqas ta' effetti tax-xfar għandu jiġi kkonfermat, kif xieraq, u jekk ikun hemm suspett ta' effetti tax-xfar, it-tifsila tal-pjastra għandha tinbidel biex jiġu evitati t-tali effetti. Pereżempju, tista' tintuża tifsila tal-pjastra li teskludi l-bwejriet tax-xfar.

30. Wara li jiżdiedu s-sustanzi kimiċi, il-pjastri tal-assaġġ għandhom ikunu inkubati f'inkubatur tas-CO2 ta' 5 % f'37±1°C għal 20-24 siegħa biex jinduċu l-prodotti tal-ġene indikatur.

31. Se jkollhom bżonn jiġu applikati kunsiderazzjonijiet speċjali għal dawk il-komposti li jkunu volatili ħafna. F'każijiet bħal dawn, il-bwejriet tal-kontroll fil-qrib jistgħu jiġġeneraw pożittivi foloz u dan għandu jiġi kkunsidrat fid-dawl tal-valuri tal-kontroll mistennija u storiċi. Fil-ftit każijiet li fihom il-volatilità tista' tkun ta' ħassib, l-użu ta' "siġillaturi tal-pjastri" jista' jgħin biex jiżola b'mod effettiv il-bwejriet individwali matul l-ittestjar, u għaldaqstant hu rakkomandat f'każijiet bħal dawn.

32. Testijiet definittivi ripetuti għall-istess sustanza kimika għandhom jitwettqu f'jiem differenti, biex tiġi żgurata indipendenza.

Assaġġ tal-luċiferaži

33. Għall-assaġġ jistgħu jintużaw reaġent kummerċjali tal-assaġġ tal-luċiferaži [eż. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510, jew ekwivalenti)] jew sistema standard ta' assaġġ tal-luċiferaži (eż. Promega, E1500, jew ekwivalenti), dment li ma jiġux ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà. Ir-reaġenti tal-assaġġ għandhom jintgħażlu fuq il-bażi tas-sensittività tal-luminometru li jkun se jintuża. Meta tintuża s-sistema standard ta' assaġġ tal-luċiferaži, għandu jintuża Reaġent tal-Liżi tal-koltura taċ-Ċeloli (eż. Promega, E1531, jew ekwivalenti) qabel ma jiżdied is-substrat. Ir-reaġent tal-luċiferaži għandu jiġi applikat skont l-istruzzjonijiet tal-manifatturi.

ANALIŻI TAD-*DATA*

Assaġġ tal-agonisti tal-ER

34. Fil-każ tal-assaġġi tal-agonisti tal-ER, biex tinkiseb l-attività traskrizzjonali relattiva għall-PC (1 nM tal-E2), is-sinjali tal-lumenixxenza mill-istess pjastra jistgħu jiġu analizzati skont l-istadji li ġejjin (proċessi matematiċi ekwivalenti oħra huma aċċettabbli wkoll):

Stadju 1. Ikkalkola l-valur medju għall-VC.

Stadju 2. Naqqas il-valur medju tal-VC mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3. Ikkalkola l-medja għall-PC normalizzat.

Stadju 4. Iddividi l-valur normalizzat ta' kull bwejra fil-pjastra bil-valur medju tal-PC normalizzat (PC=100 %).

Il-valur finali ta' kull bwejra hu l-attività traskrizzjonali relattiva għal dik il-bwejra meta mqabbla mar-rispons tal-PC.

Stadju 5. Ikkalkola l-valur medju tal-attività traskrizzjonali relattiva għal kull grupp tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Hemm żewġ dimensjonijiet għar-rispons: l-attività traskrizzjonali medja (rispons) u l-konċentrazzjoni li fiha jseħħ ir-rispons (ara t-taqsima li ġejja).

Kunsiderazzjonijiet tal-induzzjoni tal-EC_{50}, tal-PC_{50} u tal-PC_{10}

35. Il-kurva sħiħa konċentrazzjoni rispons hi meħtieġa għall-kalkolu tal-EC50, iżda din mhux dejjem tkun tista' tinkiseb jew prattika minħabba l-limitazzjonijiet tal-medda ta' konċentrazzjoni tat-test (pereżempju minħabba problemi ta' ċitotossiċità jew ta' solubbiltà). Madankollu, peress li l-EC50 u l-livell massimu ta' induzzjoni (li jikkorrispondi għall-ogħla valur tal-ekwazzjoni Hill) huma parametri informattivi, dawn il-parametri għandhom jiġu rapportati fejn possibbli. Għall-kalkolu tal-EC50 u tal-livell ta' induzzjoni massima, għandu jintuża softwer statistiku xieraq (eż. softwer statistiku Graphpad Prism). Jekk l-ekwazzjoni loġistika Hill tkun applikabbli għad-*data* ta' rispons għall-konċentrazzjoni, l-EC50 għandu jiġi kkalkolat bl-ekwazzjoni li ġejja (7):

Y=Qiegħ + (Quċċata-Qiegħ) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x pendil ta' Hill)) Fejn:

X hi l-logaritmu tal-konċentrazzjoni; u,

Y hi r-rispons u Y tibda fil-Qiegħ u titla' sal-Quċċata f'kurva sigmojde. Il-qiegħ hu fiss għal żero fl-ekwazzjoni loġistika Hill.

36. Għal kull sustanza kimika tat-test, għandhom jiġu pprovduti dawn li ġejjin:

L-RPCMax li hu l-livell massimu ta' rispons indott minn sustanza kimika tat-test, espress bħala perċentwal tar-rispons indott minn 1 nM E2 fuq l-istess pjastra, kif ukoll il-PC_{Max} (il-konċentrazzjoni assoċjata mal-RPCMax); u

Għal sustanzi kimiċi pożittivi, il-konċentrazzjonijiet li jinduċu l-PC10 u, jekk xieraq, il-PC50.

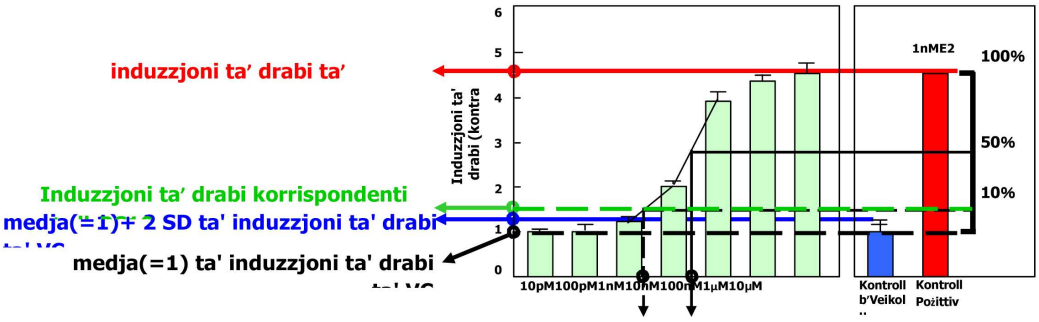
37. Il-valur tal-PCx jista' jiġi kkalkolat bl-interpolazzjoni bejn 2 punti fil-koordinat X-Y, wieħed eżatt fuq u l-ieħor eżatt taħt valur tal-PCx. Meta l-punti tad-*data* li jinsabu eżatt fuq u taħt il-valur tal-PCx ikollhom il-koordinati (a,b) u (c,d) rispettivament, il-valur tal-PCx jista' jiġi kkalkolat bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

38. Deskrizzjonijiet tal-valuri tal-PC huma pprovduti fil-Figura 1 ta' hawn taħt.

Figura 1

Eżempju ta' kif jinkisbu l-valuri tal-PC. Il-PC (1 nM of E2) hi inkluża f'kull pjastra tal-assaġġ



Assaġġ tal-antagonisti tal-ER

39. Fil-każ tal-assaġġi tal-antagonisti tal-ER, biex tinkiseb l-attività traskrizzjonali relattiva (RTA) għaż-żieda fil-kontroll (25 pM tal-E2), is-sinjali tal-lumenixxenza mill-istess pjastra jistgħu jiġu analizzati skont l-istadji li ġejjin (proċessi matematiċi ekwivalenti oħra huma aċċettabbli wkoll):

Stadju 1. Ikkalkola l-valur medju għall-VC.

Stadju 2. Naqqas il-valur medju tal-VC mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*. Stadju 3. Ikkalkola l-medja għaż-żieda normalizzata fil-kontroll.

Stadju 4. Iddividi l-valur normalizzat ta' kull bwejra fil-pjastra bil-valur medju taż-żieda normalizzata fil-kontroll (żieda fil-kontroll=100 %).

Il-valur finali ta' kull bwejra hu l-attività traskrizzjonali relattiva għal dik il-bwejra meta mqabbla mar-rispons taż-żieda fil-kontroll.

Stadju 5. Ikkalkola l-valur medju tal-attività traskrizzjonali relattiva għal kull trattament.

Kunsiderazzjonijiet tal-induzzjoni tal-IC_{30} u tal-IC_{50}

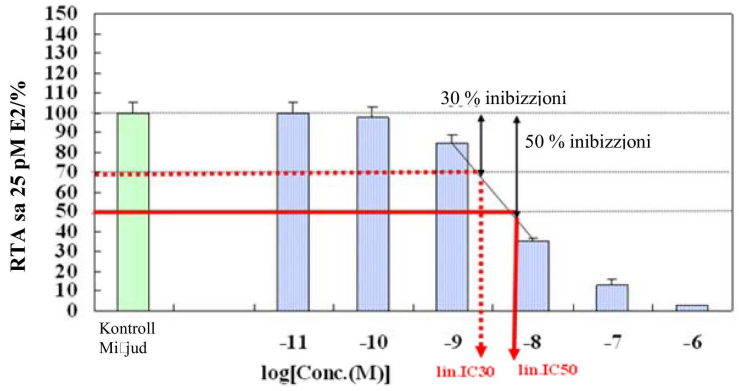
40. Għal sustanzi kimiċi pożittivi, għandhom jiġu pprovduti l-konċentrazzjonijiet li jinduċu l-IC30 u, jekk xieraq, l-IC50.

41. Il-valur tal-ICx jista' jiġi kkalkolat bl-interpolazzjoni bejn żewġ punti fil-koordinat X-Y, wieħed eżatt fuq u l-ieħor eżatt taħt valur tal-ICx. Meta l-punti tad-*data* li jinsabu eżatt fuq u taħt il-valur tal-ICx ikollhom il-koordinati (c,d) u (a,b) rispettivament, il-valur tal-ICx jista' jiġi kkalkolat bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

Figura 2

Eżempju ta' kif jinkisbu l-valuri tal-IC. Iż-żieda fil-kontroll (25 pM of E2) hi inkluża f'kull pjastra tal-assaġġ



RTA: attività traskrizzjonali relattiva

42. Ir-riżultati għandhom ikunu bbażati fuq żewġ (jew tliet) sessjonijiet indipendenti. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati komparabbli u, għalhekk, riproduċibbli, ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Biex ikunu aċċettabbli, ir-riżultati għandhom:

— Jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (ara l-Kriterji ta' aċċettabbiltà para 14-20),

— Ikunu riproduċibbli.

Il-Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

Tabella 7

Kriterji għal deċiżjonijiet pożittivi u negattivi fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER

Pożittiv	Jekk tinkiseb RPCMax li tkun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons tal-kontroll pożittiv f'tal-anqas tnejn minn żewġ sessjonijiet jew tnejn minn tlieta.
Negattiv	Jekk l-RPCMax ma tilħaqx tal-anqas l-10 % tar-rispons tal-kontroll pożittiv fi tnejn minn żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta.

Tabella 8

Kriterji għal deċiżjonijiet pożittivi u negattivi fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER

Pożittiv	Jekk l-IC30 tiġi kkalkolata f'tal-anqas tnejn minn żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta.
Negattiv	Jekk l-IC30 ma tiġix ikkalkolata f'żewġ sessjonijiet minn tnejn jew fi tnejn minn tlieta.

43. Il-kriterji ta' interpretazzjoni tad-*data* huma murija fit-Tabelli 7 u 8. Ir-riżultati pożittivi jiġu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett kif ukoll mill-konċentrazzjoni li fiha jseħħ l-effett. L-espressjoni tar-riżultati bħala konċentrazzjoni li fiha jintlaħqu 50 % (PC50) jew 10 % (PC10) tal-valuri tal-PC għall-assaġġ tal-agonisti, u 50 % (IC50) jew 30 % (IC30) tal-valur taż-żieda fil-kontroll hi inibita għall-assaġġ tal-antagonisti, u tilħaq dawn iż-żewġ għanijiet. Madankollu, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva, jekk ir-rispons massimu indott mis-sustanza kimika tat-test (RPCMax) ikun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons tal-PC f'tal-anqas tnejn miż-żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta, filwaqt li sustanza kimika tat-test titqies negattiva jekk l-RPCMax ma tilħaqx tal-anqas l-10 % tar-rispons tal-kontroll pożittiv fi tnejn miż-żewġ sessjonijiet jew fi tnejn minn tlieta.

44. Il-kalkoli tal-PC10, tal-PC50 u tal-PCMax fl-assaġġ tal-agonisti tal_ER u tal-IC30 u tal-IC50 fl-assaġġ tal-antagonisti tal-ER jistgħu jsiru bl-użu ta' spreadsheet disponibbli mal-Linja Gwida tat-Test fuq is-sit web pubbliku tal-OECD ([2]).

45. Għandu jkun biżżejjed li jinkisbu l-valuri tal-PC10 jew tal-PC50 u tal-IC30 jew tal-IC50 tal-anqas darbtejn. Madankollu, jekk il-linja bażi li tirriżulta għad-*data* fl-istess medda ta' konċentrazzjoni turi varjabbiltà b'koeffiċjent għoli b'mod inaċċettabbli ta' varjazzjoni (CV; %), id-*data* ma tistax titqies affidabbli u s-sors tal-varjabbiltà għolja għandu jiġi identifikat. Is-CV tat-triplikati tad-*data* mhux proċessata (jiġifieri *data* dwar l-intensità tal-luminexxenza) tal-punti ta' *data* li jintużaw għall-kalkolu tal-PC10 għandu jkun anqas minn 20 %.

46. L-ilħuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà jindika li s-sistema tal-assaġġ qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni partikolari tipproduċi *data* preċiża. Id-duplikazzjoni tar-riżultati tal-ewwel sessjoni hi l-aħjar garanzija li tkun ġiet prodotta *data* preċiża.

47. Fil-każ ta' assaġġ tal-agonisti tal-ER, fejn tkun meħtieġa aktar informazzjoni minbarra l-iskopijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni ta' din it-TG għal sustanzi kimiċi tat-test pożittivi, b'mod partikolari għal sustanzi kimiċi PC10-PC49, kif ukoll għal sustanzi kimiċi suspettati li jistimolaw eċċessivament il-luċiferaži, jista' jiġi kkonfermat li l-attività osservata tal-luċiferaži hi biss rispons speċifiku għall-ERα, bl-użu ta' antagonist tal-ERα (ara l-Appendiċi 2.1).

RAPPORT TAT-TEST

48. Ara l-paragrafu 20 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER".

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1 459-1 469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4 252-4 263.

([2]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) Spaepen M., *et al*. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al*. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. u Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl*. Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. u Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

Appendiċi 2.1

POŻITTIVI FOLOZ: VALUTAZZJONI TA' SINJALI TAL-LUMINEXXENZA MEDJATI MHUX TAR-RIĊETTUR

1. Pożittivi foloz fl-assaġġ tal-agonisti tal-ER jistgħu jiġu ġenerati minn attivazzjoni medjata mhux mill-ER tal-ġene luċiferaži, jew minn attivazzjoni diretta tal-prodott ġeniku jew tal-fluworexxenza mhux relatata. Effetti bħal dawn huma indikati minn kurva doża rispons mhux kompluta jew mhux tas-soltu. Jekk it-tali effetti jkunu suspettati, għandu jiġi eżaminat l-effett ta' antagonist tal-ER (eż. 4- idrossitamossifen (OHT) f'konċentrazzjoni mhux tossika) fuq ir-rispons. L-antagonist pur (ICI 1827 80 jaf ma jkunx xieraq għal dan l-għan peress li konċentrazzjoni suffiċjenti ta' ICI 1827 80 tista' tnaqqas il-valur tal-VC, u dan jaffettwa l-analiži tad-*data*.

2. Biex tiġi żgurata l-validità ta' dan l-approċċ, dawn li ġejjin għandhom jiġu ttestjati fl-istess pjastra:

   — Attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa b'1 010 μM OHT jew mingħajr

   — VC (fi triplikat)

   — OHT (fi triplikat)

   — 1 nM E2 (fi triplikat) bħala PC tal-agonist

   — 1 nM E2 + OHT (fi triplikat)

Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

Nota: Il-bwejriet kollha għandhom ikunu trattati bl-istess konċentrazzjoni tal-veikolu.

— Jekk l-attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa MHIX affettwata mit-trattament bl-antagonist tal-ER, din tiġi klassifikata bħala "Negattiva".

— Jekk l-attività agonistika tas-sustanza kimika mhux magħrufa tkun inibita għalkollox, applika l-kriterji ta' deċiżjoni.

— Jekk l-attività agonistika fl-anqas konċentrazzjoni tkun ekwivalenti għar-rispons tal-PC10 jew aktar minnu, is-sustanza kimika mhux magħrufa tkun inibita b'mod ekwivalenti għar-rispons tal-PC10 jew aktar minnu. Id-differenza fir-risponsi bejn il-bwejriet mhux trattati u dawk trattati bl-antagonist tal-ER hi kkalkolata u din id-differenza għandha titqies bħala r-rispons veru u għandha tintuża għall-kalkolu tal-parametri xierqa biex tkun tista' tittieħed deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni.

Analiži tad-*data*

Ivverifika l-istandard tal-prestazzjoni.

Ivverifika s-CV bejn il-bwejriet trattati taħt l-istess kundizzjonijiet.

1. Ikkalkola l-medja tal-VC

2. Naqqas il-medja tal-VC mill-valur ta' kull bwejra **mhux** trattata bl-OHT

3. Ikkalkola l-medja tal-OHT

4. Naqqas il-medja tal-VC mill-valur ta' kull bwejra trattata bl-OHT

5. Ikkalkola l-medja tal-PC

6. Ikkalkola l-attività traskrizzjonali relattiva tal-bwejriet l-oħra kollha b'rabta mal-PC.a

Appendiċi 2.2

PREPARAZZJONI TAS-SERUM TRATTAT B'FAĦAM MIKSI BID-DEKSTRAN (DCC)

1. It-trattament ta' serum b'faħam miksi bid-dekstran (DCC) hu metodu ġenerali għat-tneħħija ta' komposti estroġeniċi mis-serum li jiżdied mal-medium taċ-ċelloli, biex jiġi eskluż ir-rispons preġudikat assoċjat mal-estroġeni residwi fis-serum. B'din il-proċedura jistgħu jiġu trattati 500 ml serum bovin fetali (FBS).

Komponenti

2. Se jkunu meħtieġa l-materjali u t-tagħmir li ġejjin:

Materjali

Faħam attivat

Dekstran:

Eżaidrat tal-klorur tal-manjeżju (MgCl2·6H2O)

Sukrożju

Soluzzjoni mewwieta 1 M HEPES (pH 7,4)

Ilma ultrapur prodott minn sistema ta' filtri

Tagħmir

Kontenitur tal-ħġieġ awtoklavat (id-daqs għandu jiġi aġġustat kif xieraq) Ċentrifugu tal-Laboratorju Ġenerali (li jista' jissettja t-temperatura għal 4 °C)

Proċedura

3. Il-proċedura li ġejja hi aġġustata għall-użu ta' tubi ċentrifugi tal-50 ml:

[Jum 1] Ħejji s-sospensjoni ta' faħam miksi bid-dekstran b'1 l ilma ultrapur li fih 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sukrożju, 2,5 g faħam, 0,25 g dekstran u 5 mM HEPES u ħawdu f'4 °C, matul il-lejl.

[Jum 2] Iddispensa s-sospensjoni f'tubi ċentrifugi tal-50 ml u ċċentrifuga f'10 000 rpm f'4 °C għal 10 minuti. Neħħi s-supernatant u aħżen nofs is-sediment tal-faħam f'4 °C għall-użu fil-Jum 3. Issospendi n-nofs l-ieħor tal-faħam b'FBS li jkun tħalla jinħall bil-galbu biex tiġi evitata preċipitazzjoni, u inattivat bis-sħana f'56 °C għal 30 minuta, imbagħad ittrasferixxi f'kontenitur tal-ħġieġ awtoklavat bħal flask Erlenmeyer. Ħawwad din is-sospensjoni bil-galbu f'4 °C, matul il-lejl.

[Jum 3] Iddispensa s-sospensjoni b'FBS f'tubi ċentrifugi għal ċentrifugazzjoni f'10 000 rpm f'4 °C għal 10 minuti. Iġbor l-FBS u ttrasferixxi fis-sediment tal-faħam il-ġdid imħejji u maħżun fil-Jum 2. Issospendi s-sediment tal-faħam u ħawwad din is-sospensjoni bil-galbu f'kontenitur tal-ħġieġ awtoklavat f'4 °C, matul il-lejl.

[Jum 4] Iddispensa s-sospensjoni għaċ-ċentrifugazzjoni f'10 000 rpm f'4 °C għal 10 minuti u sterlizza s-supernatant b'filtazzjoni permezz tal-filtru sterili ta' 0,2 μm. Dan l-FBS trattat bid-DCC għandu jinħażen f'-20 °C u jista' jintuża sa sena.

Appendiċi 3

ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU VM7LUC GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TAL-AGONISTI U TAL-ANTAGONISTI TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. Dan l-assaġġ juża l-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2 ([1]). Ġie validat min-National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), u mill-Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (1). Il-linji ta' ċelloli VM7Luc jesprimu b'mod predominanti ERα endoġenu u ammont minuri ta' ERβ endoġenu (2) (3) (4).

2. Dan l-assaġġ hu applikabbli għal firxa kbira ta' sustanzi, dment li ma jkunux jistgħu jiġu dissolti f'sulfossidu tad-dimetil (DMSO; CASRN 67-68-5), ma jirreaġixxux ma' DMSO jew mal-medium tat-tkabbir taċ-ċelloli, u ma jkunux ċitotossiċi fil-konċentrazzjonijiet li jkunu se jiġu ttestjati. Jekk l-użu tad-DMSO ma jkunx possibbli, jista' jintuża veikolu ieħor bħall-etanol jew l-ilma (ara l-paragrafu 12). Il-prestazzjoni murija tal-assaġġ tal-(ant)agonisti TA tal-ER VM7Luc tissuġġerixxi li d-*data* ġenerata b'dan l-assaġġ tista' tinforma mekkaniżmi ta' azzjoni medjati bl-ER u tista' tiġi kkunsidrata għall-prijoritizzazzjoni tas-sustanzi għall-ittestjar ulterjuri.

3. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa TA medjata minn hERα u minn hERß billi jkejjel il-kemiluminexxenza bħala l-punt ta' tmiem. L-użu tal-kemiluminexxenza fil-bijoassaġġi hu mifrux minħabba li l-luminexxenza għandha proporzjon għoli ta' sinjal għall-isfond. Madankollu, l-attività tal-luċiferaži tal-firefly f'assaġġi bbażati fuq ċelloli tista' tiġi konfuża minn sustanzi li jinibixxu l-enzima luċiferaži, u tikkawża inibizzjoni apparenti jew inkella luminexxenza miżjuda minħabba l-istabbilizzazzjoni tal-proteini. Barra minn hekk, f'ċreti assaġġi tal-ġene indikatur tal-ER ibbażati fuq il-luċiferaži, sinjali ta' luminexxenza medjata mhux minn riċettur ġew rapportati f'konċentrazzjonijiet ta' fitoestroġenu ogħla minn 1 μM minħabba l-attivazzjoni eċċessiva tal-ġene indikatur tal-luċiferaži. Filwaqt li l-kurva ta' doża - rispons tindika li l-attivazzjoni vera tas-sistema tal-ER isseħħ f'konċentrazzjonijiet inferjuri, l-espressjoni tal-luċiferaži miksuba f'konċentrazzjonijiet ogħla ta' fitoestroġeni jew ta' komposti simili suspettati li jipproduċu attivazzjoni eċċessiva simili għal fitoestroġenu tal-ġene indikatur tal-luċiferaži trid tiġi eżaminata bir-reqqa f'sistemi tal-assaġġ TA tal-ER transfettati b'mod stabbli.

4. Għandhom jinqraw "INTRODUZZJONI ĠENERALI" u "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. L-assaġġ jintuża biex jindika l-irbit tal-ligand tal-ER, segwit minn traslokazzjoni tal-kumpless riċettur-ligand għan-nukleu. Fin-nukleu, il-kumpless riċettur-ligand jillega ma' elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva l-ġene rapportatur (*luc*), li jirriżulta fil-produzzjoni ta' luċiferaži u fl-emissjoni sussegwenti tad-dawl, li tista' tiġi kwantifikata bl-użu ta' luminometru. L-attività tal-luċiferaži tista' tiġi evalwata malajr u mingħajr ma jintefqu wisq flus b'numru ta' kits disponibbli kummerċjalment. It-TA tal-ER VM7Luc juża linja ta' ċelloli tal-adenokarċinoma tas-sider uman risponsiva għall-ER, VM7, li ġiet transfettata b'mod stabbli b'binja indikatur tal-*luc* tal-firefly taħt il-kontroll ta'

([1]) Qabel Ġunju 2016, din il-linja ta' ċelloli kienet imsejħa l-linja ta' ċelloli BG1Luc. Iċ-ċelloli BG-1 oriġinarjament kienu deskritti minn Geisinger et al. (1998) (12) u aktar tard ġew karatterizzati mir-riċerkaturi fin-National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). B'mod relattivament riċenti, ġie skopert li jeżistu żewġ varjanti differenti taċ-ċelloli BG-1 li jintużaw mir-riċerkaturi, BG-1 Fr u BG-1 NIEHS. Analiżi approfondita, li tinkludi ttestjar tad-DNA, ta' dawn iż-żewġ linji ta' ċelloli varjanti tal-BG-1 saret minn Li u l-kollegi (2014) (14) uriet li l-BG-1 Fr kienet unika u li l-BG-1 NIEHS, jiġifieri l-linja ta' ċelloli oriġinali użata għall-iżvilupp tal-assaġġ, ma kinitx il-linja ta' ċelloli tal-karċinoma ovarjana umana BG1, iżda minflok kienet varjant tal-linja ta' ċelloli tal-kanċer tas-sider uman MCF7. Il-linja ta' ċelloli użata fl-assaġġ, oriġinarjamen imsejħa BG1Luc4E2 (15), issa se tibda tissejjaħ VM7Luc4E2 ("V" = varjant; "M7" = ċelloli MCF7). Bl-istess mod, l-assaġġ issa se jibda jissejjaħ it-TA tal-ER VM7Luc. Filwaqt li dan ibiddel l-oriġini tal-linja ta' ċelloli li fuqha hu bbażat l-assaġġ, dan ma jaffettwax l-istudji ta' validazzjoni ppubblikati u lanqas l-utilità u l-applikazzjoni ta' dan l-assaġġ għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi/antiestroġeniċi.

erba' elementi ta' rispons tal-estroġenu mqiegħda upstream mill-promotur tal-vajrus tat-tumur mammarju tal-ġrieden (MMTV), biex jiġu identifikati sustanzi b'attività agonista jew antagonista tal-ER *in vitro*. Dan il-promotur tal-MMTV jesibixxi biss reattività inkroċjata minuri ma' ormoni sterojde u mhux sterojde oħrajn (8). Il-kriterji għall-interpretazzjoni tad-*data* huma deskritti fid-dettall fil-paragrafu 41. Fil-qosor, rispons pożittiv jiġi identifikat minn kurva konċentrazzjoni rispons li jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba (medja ± SD), kif ukoll tibdil fl-amplitudni (unità tad-dawl relattiva normalizzata [RLU]) ta' tal-anqas 20 % tal-valur massimali għall-istandard referenzjarju (17β-estradjol [E2; CASRN 50-28-2] għall-assaġġ tal-agonisti, raloksifen HCl [Ral; CASRN 84 449-90-1]/E2 għall-assaġġ tal-antagonisti).

PROĊEDURA

Linja ta' Ċelloli

6. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli VM7Luc4E2 għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli bħalissa hi disponibbli biss bi ftehim ta' liċenzjar tekniku mill-University of California, Davis, California, l-Istati Uniti ([2]), u minn Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, l-Istati Uniti ([3]).

Stabbiltà tal-Linja ta' Ċelloli

7. Biex jinżammu l-istabbiltà u l-integrità tal-linja ta' ċelloli, iċ-ċelloli għandhom jitkabbru għal aktar minn passaġġ wieħed mill-istokk friżat fil-media ta' żamma taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 9). Iċ-ċelloli ma għandhomx jiġu kolturati għal aktar minn 30 passaġġ. Għal-linja ta' ċelloli VM7Luc4E2, 30 passaġġ se jkunu bejn wieħed u ieħor tliet xhur.

Koltura taċ-Ċelloli u Kundizzjonijiet tal-Pjastrament

8. Il-proċeduri speċifikati fil-Gwida dwar Prattika Tjaba tal-Koltura taċ-Ċelloli (5) (6) għandhom jiġu segwiti biex tiġi żgurata l-kwalità tal-materjali u tal-metodi kollha biex jinżammu l-integrità, il-validità u r-riproduċibbiltà ta' kwalunkwe ħidma mwettqa.

9. Iċ-ċelloli VM7Luc4E2 jinżammu f'medium RPMI 1 640 supplimentat b'0,9 % Pen-Strep u bi 8,0 % serum bovin fetali (FBS) f'inkubatur tal-koltura tat-tessuti dedikat f'37°C ± 1°C, 90 % ± 5 % umdità, u f'5,0 % ± 1 % CO_2/arja.

10. Malli jilħqu konfluwenza ta' ~80 %, iċ-ċelloli VM7Luc4E2 jiġu subkolturati u kundizzjonati għal ambjent ħieles minn estroġenu għal 48 siegħa qabel il-pjastrament taċ-ċelloli fi pjastri b'96 bwejra għall-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test u għall-analiżi tal-induzzjoni dipendenti mill-estroġenu tal-attività ta' luċiferaži. Il-medium ħieles mill-estroġenu (EFM) fih Modifika ta' Dulbecco tal-Medium ta' Eagle (DMEM) mingħajr fenol aħmar, supplimentat b'4,5 % FBS trattat bil-faħam/bid-dekstran, 1,9 % L-glutammina, u 0,9 % Pen-Strep. Kull oġġett tal-plastik għandu jkun ħieles minn attività estroġenika [ara l-protokoll dettaljat (7)].

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

11. L-aċċettazzjoni jew ir-rifjut ta' test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni ta' standard referenzjarju u r-riżultati tal-kontroll minn kull esperiment imwettaq fi pjastra b'96 bwejra. Kull standard referenzjarju jiġi ttestjat f'konċentrazzjonijiet multipli u hemm diversi kampjuni ta' kull konċentrazzjoni ta' referenza u ta' kontroll. Ir-riżultati jitqabblu mal-kontrolli tal-kwalità (QC) għal dawn il-parametri li ġew derivati mill-bażijiet ta' *data* storiċi dwar l-agonisti u

([2]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E: msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

([3]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, posta elettronika: info@dioxins.com, Telefown: 919-688-4804, Fax: 919-688-4404

l-antagonisti ġenerati minn kull laboratorju matul il-wiri tal-profiċjenza. Il-bażijiet ta' *data* storiċi huma aġġornati b'valuri tal-istandards referenzjarji u tal-kontroll fuq bażi kontinwa. Tibdiliet fit-tagħmir jew fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju jistgħu jesiġu ġenerazzjoni ta' bażijiet ta' *data* storiċi aġġornati.

Test tal-Agonisti

Test għas-Sejbien tal-Medda

- Induzzjoni: L-induzzjoni tal-pjastri għandha titkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-unità tad-dawl relattiva (RLU) tal-istandard referenzjarju E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO. Normalment tinkiseb induzzjoni għal ħames darbiet, iżda għall-fini ta' aċċettazzjoni, l-induzzjoni għandha tkun ekwivalenti għal erba' darbiet jew aktar.

- Riżultati tal-kontroll bid-DMSO: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'solvent għandhom ikunu fi ħdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b'solvent.

- Esperiment li jonqos milli jilħaq wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni għandu jiġi injorat u ripetut.

Test Komprensiv

Dan jinkludi l-kriterji ta' aċċettabbiltà mit-test tas-sejba tal-medda tal-agonisti u dawn li ġejjin:

- Ir-riżultati tal-istandards referenzjarji: Il-kurva konċentrazzjoni rispons tal-istandard referenzjarju E2 għandha tkun ta' forma sigmojde u jkollha tal-anqas tliet valuri fi ħdan it-taqsima lineari tal-kurva konċentrazzjoni rispons.

- Riżultati tal-kontroll pożittiv: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'metossiklor għandhom ikunu akbar mill-medja tad-DMSO flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard mill-medja tad-DMSO.

- Esperiment li jonqos milli jilħaq xi wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni għandu jiġi injorat u ripetut.

Test tal-Antagonisti

Test għas-Sejbien tal-Medda

- Tnaqqis: It-tnaqqis tal-pjastri jitkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-RAL/tal-istandard referenzjarju tal-E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO. Normalment jinkiseb tnaqqis ta' ħames darbiet, iżda għall-finijiet ta' aċċettazzjoni, it-tnaqqis għandu jkun ekwivalenti għal tliet darbiet jew aktar.

- Ir-riżultati tal-kontroll b'E2: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'E2 għandhom ikunu fi ħdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b'E2.

- Riżultati tal-kontroll bid-DMSO: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO għandhom ikunu fi ħdan 2,5 darbiet id-devjazzjoni standard tal-valur medju storiku tal-RLU tal-kontroll b'solvent.

• Esperiment li jonqos milli jilħaq xi wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni jiġi injorat u ripetut.

Test Komprensiv

Dan jinkludi l-kriterji ta' aċċettazzjoni mit-test tas-sejba tal-medda tal-antagonisti u dawn li ġejjin:

• Ir-riżultati tal-istandards referenzjarji: Il-kurva konċentrazzjoni rispons tal-istandard referenzjarju Ral/E2 għandha tkun ta' forma sigmojde u jkollha tal-anqas tliet valuri fi ħdan it-taqsima lineari tal-kurva konċentrazzjoni rispons.

• Riżultati tal-kontroll pożittiv: Il-valuri tal-RLU tal-kontroll b'tamossifen/E2 għandhom ikunu anqas mill-medja tal-kontroll b'E2 nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard mill-medja tal-kontroll b'E2.

• Esperiment li jonqos milli jilħaq xi wieħed mill-kriterji ta' aċċettazzjoni jiġi injorat u ripetut.

Standards ta' Referenza, Pożittivi, u Kontrolli b'Veikolu

Kontroll b'Veikolu (Assaġġi Agonisti u Antagonisti)

12. Il-veikolu li jintuża biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'veikolu. Il-veikolu użat matul il-validazzjoni tal-assaġġ TA tal-ER VM7Luc kien ta' 1 % (v/v) dimetilsulfossidu (DMSO, CASRN 67-68-5) (ara l-paragrafu 24). Jekk jintuża veikolu ieħor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu, jekk dan ikun xieraq.

Standard ta' Referenza (Sejbien tal-Medda tal-Agonisti)

13. L-istandard referenzjarju hu E2 (CASRN 50-28-2). Għall-ittestjar tas-sejbien tal-medda, l-istandard ta' refernza hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' erba' konċentrazzjonijiet ta' E2 (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} u 2,87 x 10^{-12} M), b'kull konċentrazzjoni ttestjata fi bwejriet duplikati.

Standard Referenzjarju (Inklużi l-Agonisti)

14. E2 għall-ittestjar komprensiv hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' 1:2 li tikkonsisti fi 11-il konċentrazzjoni (li jvarjaw minn
3,67 x 10^{-10} sa 3,59 x 10^{-13} M) tal-E2 fi bwejriet duplikati.

Standard ta' Referenza (Sejbien tal-Medda tal-Antagonisti)

15. L-istandard referenzjarju hu taħlita tal-Ral (CASRN 84 449-90-1) u tal-E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 rgħall-ittestjar tas-sejbien tal-medda hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' tliet konċentrazzjonijiet ta' Ral (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10}, u 1,92 x 10^{-10}M) flimkien ma' konċentrazzjoni fissa (9,18 × 10^{-11} M) ta' E2 fi bwejriet duplikati.

Standard Referenzjarju (Inklużi l-Antagonisti)

16. Ral/E2 għall-ittestjar komprensiv hu msawwar minn dilwizzjoni serjali ta' 1:2 ta' Ral (li tvarja minn 2,45x 10^{-8} sa 9,57 x 10^{-11}M) flimkien ma' konċentrazzjoni fissa (9,18 × 10^{-11} M) ta' E2 li tikkonsisti f'disa' konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 fi bwejriet duplikati.

Kontroll Pożittiv Dgħajjef (Agonist)

17. Il-kontroll pożittiv dgħajjef hu 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metossiklor (metossiklor; CASRN 72-43-5) fl-EFM.

Kontroll Pożittiv Dgħajjef (Antagonist)

18. Il-kontroll pożittiv dgħajjef jikkonsisti f'tamossifen (CASRN 10 540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M b'9,18 × 10^{-11} M E2 fl-EFM.

Kontroll tal-E2 (Assaġġ tal-Antagonisti Biss)

19. Il-kontroll tal-E2 hu 9,18 × 10^{-11} M E2 fl-EFM u jintuża bħala kontroll negattiv tal-linja bażi.

Induzzjoni tad-Drabi (Agonist)

20. L-induzzjoni tal-attività ta' luċiferaži tal-istandard referenzjarju (E2) titkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-RLU tal-istandard referenzjarju b'E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO, u r-riżultat għandu jkun akbar minn erba' darbiet.

Tnaqqis tad-Drabi (Antagonist)

21. L-attività medja ta' luċiferaži tal-istandard referenzjarju (Ral/E2) titkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla valur medju tal-RLU tal-istandard referenzjarju b'Ral/E2 bil-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO, u għandu jkun akbar minn tliet darbiet.

Wiri tal-Proficjenza tal-Laboratorju (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f"KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" ta' dan il-metodu ta' ttestjar)

Veikolu

22. Is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu dissolti f'solvent li jissolubilizza s-sustanza kimika tat-test u li jitħallat mal-medium taċ-ċelloli. L-ilma, l-etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) u d-DMSO huma veikoli xierqa. Jekk jintuża d-DMSO, il-livell ma għandux jaqbeż il-1 % (v/v). Għal kwalunkwe veikolu, għandu jintwera li l-volum massimu użat mhuwiex ċitotossiku u ma jinterferixxix mat-twettiq tal-assaġġ. L-istandards referenzjarji u l-kontrolli jiġu dissolti f'solvent 100 % u mbagħad jiġi dilwiti f'konċentrazzjonijiet xierqa fl-EFM.

Preparazzjoni tas-Sustanzi kimiċi tat-test

23. Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti fid-DMSO 100 % (jew solvent xieraq), u mbagħad jiġu dilwiti f'konċentrazzjonijiet xierqa fl-EFM. Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jitħallew jekwilibraw f'temperatura ambjentali qabel ma jiġu dissolti u dilwiti. Is-soluzzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jitħejjew friski għal kull esperiment. Is-soluzzjonijiet ma għandux ikollhom preċipitat jew dardir notevoli. L-istokks ta' standards referenzjarji u ta' kontroll jistgħu jitħejjew bl-ingrossa; madankollu, l-istandard referenzjarju, id-dilwizzjonijiet ta' kontroll u s-sustanzi kimiċi tat-test finali għandhom jitħejjew friski għal kull esperiment u jintużaw fi żmien 24 siegħa mit-tħejjija.

Solubbiltà u Ċitotossiċità: Kunsiderazzjonijiet għas-Sejbien tal-Medda

24. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'dilwizzjonijiet serjali ta' 1:10 b'seba' punti mwettqa f'duplikati. Għall-ewwel, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati sal-konċentrazzjoni massima ta' 1 mg/ml (~1 mM) għall-ittestjar tal-agonisti u ta' 20 µg/ml (~10 µM) għall-ittestjar tal-antagonisti. Jintużaw esperimenti ta' sejbien tal-medda biex jiġu determinati dawn li ġejjin:

— Il-konċentrazzjonijiet tal-bidu tas-sustanza kimika tat-test li għandhom jintużaw matul l-ittestjar komprensiv

— Id-dilwizzjonijiet (1:2 jew 1:5) tas-sustanza kimika tat-test li għandhom jintużaw matul l-ittestjar komprensiv

25. Valutazzjoni tal-vijabbiltà/taċ-ċitotossiċità taċ-ċelloli hi inkluża fil-protokolli tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (7) u hi inkorporata fl-ittestjar għas-sejbien tal-medda u komprensiv. Il-metodu taċ-ċitotossiċità li ntuża biex tiġi vvalutata l-vijabbiltà taċ-ċelloli matul il-validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc (1) kien metodu ta' osservazzjoni viżwali kwalitattiva skalat; madankollu, jista' jintuża metodu kwantitattiv għad-determinazzjoni taċ-ċitotossiċità (ara l-protokoll (7)). Ma tistax tintuża *data* minn konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test li jikkawżaw tnaqqis akbar minn 20 % fil-vijabbiltà.

Esponiment għas-Sustanza Kimika tat-Test u Organizzazzjoni tal-Pjastra tal-Assaġġ

26. Iċ-ċelloli jingħaddu u jitqiegħdu fi pjastri tal-koltura tat-tessuti b'96 bwejra (2 x 10^5 ċelloli għal kull bwejra) f'EFM u jiġu inkubati għal 24 siegħa biex iċ-ċelloli jitħallew jaqbdu mal-pjastra. L-EFM jitneħħa u jiġi sostiwit bis-sustanzi kimiċi tat-test u ta' referenza fl-EFM u jiġi inkubat għal 19-24 siegħa. Se jkollhom jiġu applikati kunsiderazzjonijiet speċjali għal dawk is-sustanzi li jkunu volatili ħafna peress li l-bwejriet tal-kontroll fil-viċin jistgħu jiġġeneraw riżultati pożittivi foloz. F'każijiet bħal dawn, "siġillanti tal-pjastri" jistgħu jgħinu biex effettivament jiżolaw il-bwejriet individwali matul l-ittestjar, u għalhekk huma rakkomandati.

Testijiet ta' Sejbien tal-Medda

27. L-ittestjar tas-sejbien tal-medda juża l-bwejriet kollha tal-pjastra b'96 bwejra biex jittestja sa sitt sustanzi kimiċi tat-test bħala dilwizzjonijiet serjali 1:10 b'seba' punti f'duplikat (ara l-Figuri 1 u 2).

— L-ittestjar tas-sejbien tal-medda *tal-agonisti* juża erba' konċentrazzjonijiet ta' E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju u erba' bwejriet replikati għall-kontroll bid-DMSO.

— L-ittestjar tas-sejbien tal-medda *tal-antagonisti* juża tliet konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 b'9,18 × 10^{-11} M E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju bi tliet bwejriet replikati għall-kontrolli b'E2 u bid-DMSO.

Figura 1

Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra għat-Test tas-Sejbien tal-Medda tal-Agonisti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VC	VC	VC	VC	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abbrevjazzjonijiet: E2-1 sa E2-4 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'E2 (minn għoljin sa baxxi); TC1-1 sa TC1-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); TC3-1 sa TC3-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 3 (TC3); TC4-1 sa TC4-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 4 (TC4); TC5-1 sa TC5-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 5 (TC5); TC6-1 sa TC6-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 6 (TC6); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Figura 2

Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra għat-Test tas-Sejbien tal-Medda tal-Antagonisti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VC	VC	VC	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abbrevjazzjonijiet: E2 = kontroll b'E2; Ral-1 sa Ral-3 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'Raloksifen/E2 (minn għoljin sa baxxi); TC1-1 sa TC1-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); TC3-1 sa TC3-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 3 (TC3); TC4-1 sa TC4-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 4 (TC4); TC5-1 sa TC5-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 5 (TC5); TC6-1 sa TC6-7 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 6 (TC6); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha jiġu ttestjati fil-preżenza ta' 9,18 × 10-11 M E2.28.
Il-volum finali rakkomandat tal-media meħtieġ għall kull bwejra hu ta' 200 µl. Uża biss pjastri tat-test li fihom iċ-ċelloli fil-bwejriet kollha jagħtu vijabbiltà ta' 80 % u aktar.

29. Id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-ittestjar komprensiv tal-***agonisti*** hi deskritta fid-dettall fil-protokoll tal-agonisti (7). Fil-qosor, jintużaw il-kriterji li ġejjin:

— Jekk ma jkun hemm ebda punt fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkun akbar mill-medja flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll bid-DMSO, l-ittestjar komprensiv isir bl-użu ta' dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt li tibda bil-konċentrazzjoni solubbli massima.

— Jekk ikun hemm punti fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkunu akbar mill-medja flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll bid-DMSO, il-konċentrazzjoni tal-bidu li tkun se tintuża għall-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt f'ittestjar komprensiv għandha tkun log ogħla mill-konċentrazzjoni li tagħti l-ogħla valur aġġustat tal-RLU fis-sejbien tal-medda. L-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt se tkun ibbażata fuq dilwizzjonijiet 1:2 jew 1:5 skont il-kriterji li ġejjin:

Għandha tintuża dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt jekk il-medda ta' konċentrazzjoni li tirriżulta tkopri l-medda sħiħa ta' risponsi fuq il-bażi tal-kurva ta' rispons tal-konċentrazzjoni ġenerata fit-test tas-sejbien tal-medda. Inkella, uża dilwizzjoni ta' 1:5.

— Jekk sustanza kimika tat-test turi kurva konċentrazzjoni rispons bifażika fit-test tas-sejbien tal-medda, iż-żewġ fażijiet għandhom ikunu solvuti fl-ittestjar komprensiv ukoll.

30. Id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-ittestjar komprensiv tal-***antagonisti*** hi deskritta fid-dettall fil-protokoll tal-antagonisti (7). Fil-qosor, jintużaw il-kriterji li ġejjin:

— Jekk ma jkun hemm ebda punt fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkun anqas mill-medja nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll b'E2, l-ittestjar komprensiv isir bl-użu ta' dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt li tibda bil-konċentrazzjoni solubbli massima.

— Jekk ikun hemm punti fil-kurva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li jkunu anqas mill-medja nieqes tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-kontroll b'E2, il-konċentrazzjoni tal-bidu li tkun se tintuża għall-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt f'ittestjar komprensiv għandha tkun waħda minn dawn li ġejjin:

• Il-konċentrazzjoni li tagħti l-anqas valur aġġustat tal-RLU fis-sejbien tal-medda

• Il-konċentrazzjoni solubbli massima (Ara l-protokoll tal-antagonisti (7), Figura 14-2)

• L-anqas konċentrazzjoni ċitotossika (Ara l-protokoll tal-antagonisti (7), Figura 14-3 għal eżempju relatat)

— L-iskema ta' dilwizzjoni bi 11-il punt se tkun ibbażata fuq serjali jew dilwizzjoni ta' 1:2 jew 1:5 skont il-kriterji li ġejjin:

Għandha tintuża dilwizzjoni serjali 1:2 bi 11-il punt jekk il-medda ta' konċentrazzjoni li tirriżulta tkopri l-medda sħiħa ta' risponsi fuq il-bażi tal-kurva ta' rispons tal-konċentrazzjoni ġenerata fit-test tas-sejbien tal-medda. Inkella għandha tintuża dilwizzjoni ta' 1:5.

Testijiet Komprensivi

31. L-ittestjar komprensiv jikkonsisti f'dilwizzjonijiet serjali bi 11-il punt (dilwizzjonijiet serjali ta' 1:2 jew 1:5 fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni tal-bidu għall-kriterji ta' ttestjar komprensiv) b'kull konċentrazzjoni ttestjata fi bwejriet triplikati tal-pjastra b'96 bwejra (ara l-Figuri 3 u 4).

— L-ittestjar komprensiv tal-*agonisti* juża 11-il konċentrazzjoni ta' E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju. Erba' bwejriet replikati għal-kontroll bid-DMSO u erba' bwejriet repliki għall-kontroll b'metossiklor (9,06 x 10^{-6} M) jiġu inklużi f'kull pjastra.

— L-ittestjar komprensiv tal-*antagonisti* juża disa' konċentrazzjonijiet ta' Ral/E2 b'9,18 × 10^{-11} M E2 f'duplikat bħala l-istandard referenzjarju, b'erba' bwejriet repliki għall-kontroll b'E2 9,18 x 10^{-11} M, erba' bwejriet repliki għall-kontrolli bid-DMSO, u erba' bwejriet repliki għat-tamossifen 3,36 x 10^{-6}M.

Figura 3

Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra għat-Test Komprensiv tal-Agonisti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Met
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Met

Abbrevjazzjonijiet: TC1-1 sa TC1-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1; TC2-1 sa TC2-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2; E2-1 sa E2-11 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'E2 (minn għoljin sa baxxi); Met = kontroll pożittiv dgħajjef b'p,p' metossiklor; VC = kontroll b'veikolu tal-EFM bid-DMSO (1 % v/v)

Figura 4

Tifsila tal-Pjastra b'96 bwejra għat-Test Komprensiv tal-Antagonisti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VC
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VC
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abbrevjazzjonijiet: E2 = kontroll b'E2; Ral-1 sa Ral-9 = konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju b'Raloksifen/E2 (minn għoljin sa baxxi); Tam = kontroll pożittiv dgħajjef b'Tamossifen/E2; TC1-1 sa TC1-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 1 (TC1); TC2-1 sa TC2-11 = konċentrazzjonijiet (minn għoljin sa baxxi) tas-sustanza kimika tat-test 2 (TC2); VC = kontroll b'veikolu (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Nota: Kif innotat, kull bwejra ta' referenza u tat-test ikun fiha konċentrazzjoni fissa ta' E2 (9,18 x 10-11M)32. Testijiet komprensivi ripetuti għall-istess sustanza kimika għandhom jitwettqu f'jiem differenti, biex tiġi żgurata indipendenza. Tal-anqas għandhom isiru żewġ testijiet komprensivi. Jekk ir-riżultati tat-testijiet jikkontradixxu lil xulxin (eż. test minnhom ikun pożittiv, u l-ieħor negattiv), jew jekk wieħed mit-testijiet ikun inadegwat, għandu jsir it-tielet test addizzjonali.

Kejl tal-Luminexxenza

33. Il-luminexxenza titkejjel fil-medda ta' 300 sa 650 nm, bl-użu ta' luminometru tal-injezzjoni u b'softwer li jikkontrolla l-volum tal-injezzjoni u l-intervall tal-kejl (7). L-emissjoni tad-dawl minn kull bwejra hi espressa bħala RLU għal kull bwejra.

ANALIŻI TAD-*DATA*

Determinazzjoni tal-EC_{50} /IC_{50}

34. Il-valur tal-EC_{50} (il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test [agonisti]) u l-valur tal-IC_{50} (il-konċentrazzjoni inibitorja medjana ta' sustanza kimika tat-test [antagonisti]) huma determinati mid-*data* dwar ir-rispons għall-konċentrazzjoni. Għal sustanzi kimiċi tat-test li huma pożittivi f'waħda mill-konċentrazzjonijiet jew aktar, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża rispons medjana (IC_{50} jew EC_{50}) hi kkalkolata bl-użu ta' analiżi tal-funzjoni Hill jew ta' alternattiva xierqa. Il-funzjoni Hill hi mudell matematiku loġistiku b'erba' parametri relatat mal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mar-rispons (tipikament skont kurva sigmojde) bl-użu tal-ekwazzjoni ta' hawn taħt:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Hill\ Slope}$$

Fejn:

Y= rispons (jiġifieri RLUs);

X= il-logaritmu tal-konċentrazzjoni;

Il-qiegħ= ir-rispons minimu;

Il-quċċata= ir-rispons massimu;

lg EC_{50} (jew lg IC_{50})= il-logaritmu ta' X bħala n-nofs tar-rispons bejn il-Quċċata u l-Qiegħ;

Hillslope= il-gradjent tal-kurva.

Il-mudell jikkalkola liema huma l-aktar xierqa għall-parametri tal-Quċċata, tal-Qiegħ, tal-Hillslope, u tal-IC_{50} u tal-EC_{50}. Għall-kalkolu tal-valuri tal-EC_{50} u tal-IC_{50}, għandu jintuża softwer statistiku xieraq (eż. softwer statistiku Graphpad Prism®).

Determinazzjoni tal-Eċċezzjonijiet Estremi

35. Ġudizzju statistiku tajjeb jista' jiġi ffaċilitat billi jiġi inkluż it-test-Q (iżda mhux limitat għalih biss) (ara l-protokolli tal-agonisti u tal-antagonisti (7) għad-determinazzjoni ta' bwejriet "mhux utilizzabbli" li se jiġu eskluži mill-analiżi tad-*data*.

36. Għal repliki tal-istandard referenzjarju b'E2 (daqs ta' tnejn tal-kampjun), kwalunkwe valur aġġustat tal-RLU għal replika f'konċentrazzjoni partikolari ta' E2 jitqies eċċezzjoni estrema jekk il-valur tiegħu jkun aktar minn 20 % aktar jew anqas mill-valur tal-RLU aġġustat għal dik il-konċentrazzjoni fil-bażi ta' *data* storika.

Il-Ġbir u l-Aġġustament tad-*Data* tal-Luminometru għall-Ittestjar tas-Sejbien tal-Medda

37. Id-*data* mhux proċessata mil-luminometru għandha tiġi trasferita fi spreadsheet mudell imfassla għall-assaġġ. Għandu jiġi determinat jekk hemmx punti ta' *data* li jkunu eċċezzjonijiet estremi li jridu jitneħħew. (Ara l-Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test għal parametri li huma determinati fl-analiżijiet). Għandhom isiru l-kalkoli li ġejjin:

Agonist

Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-kontroll b'veikolu (VC) DMSO.

Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (E2).

Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-EC_{50} għas-sustanzi kimiċi tat-test.

Antagonist

Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.

Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3 Ikkalkola t-tnaqqis medju tad-drabi għall-istandard referenzjarju (Ral/E2).

Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju għall-istandard referenzjarju b'E2.

Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju tal-IC50 għas-sustanzi kimiċi tat-test.

Il-Ġbir u l-Aġġustament tad-*Data* tal-Luminometru għall-Ittestjar Komprensiv

38. *Data* mhux proċessata mil-luminometru għandha tiġi trasferita fi spreadsheet mudell imfassla għall-assaġġ. Għandu jiġi determinat jekk hemmx punti ta' *data* li jkunu eċċezzjonijiet estremi li jridu jitneħħew. (Ara l-Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test għal parametri li huma determinati fl-analiżijiet). Isiru l-kalkoli li ġejjin:

Agonist

Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.

Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (E2).

Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-EC_{50} għall-E2 u għas-sustanzi kimiċi tat-test.

Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju aġġustat tal-RLU għall-metossiklor.

Antagonist

Stadju 1 Ikkalkola l-valur medju għall-VC DMSO.

Stadju 2 Naqqas il-valur medju tal-VC DMSO mill-valur ta' kull bwejra biex tinnormalizza d-*data*.

Stadju 3 Ikkalkola l-induzzjoni medja tad-drabi għall-istandard referenzjarju (Ral/E2).

Stadju 4 Ikkalkola l-valur medju tal-IC_{50} għall-Ral/E2 u għas-sustanzi kimiċi tat-test.

Stadju 5 Ikkalkola l-valur medju aġġustat tal-RLU għat-tamossifen.

Stadju 6 Ikkalkola l-valur medju għall-istandard referenzjarju b'E2.

Il-Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

39. It-TA tal-ER VM7Luc hu maħsub bħala parti minn approċċ tal-piż tal-evidenza biex jgħin fil-prijoritizzazzjoni tas-sustanzi għall-ittestjar tal-ED *in vivo*. Parti minn din il-proċedura ta' prijoritizzazzjoni se tkun il-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala pożittiva jew negattiva għall-attività agonista jew antagonista tal-ER. Il-kriterji ta' deċiżjoni pożittiva u negattiva użati fl-istudju ta' validazzjoni tat-TA tal-ER VM7Luc huma deskritti fit-Tabella 1.

Tabella 1

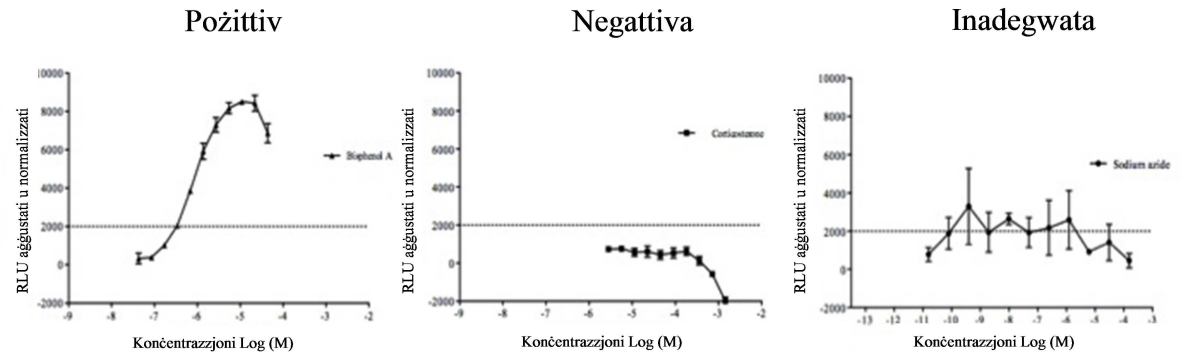
Kriterji ta' Deċiżjoni Pożittiva u Negattiva

ATTIVITÀ AGONISTA	
Pożittiva	— Is-sustanzi kimiċi tat-test kollha klassifikati bħala *pożittivi għal* attività agonista tal-ER għandu jkollhom kurva konċentrazzjoni-rispons li tikkonsisti f'linja bażi, segwita minn pendil pożittiv, u li tikkonkludi fi plateau jew f'quċċata. F'xi każijiet, tnejn biss minn dawn il-karatteristiċi (linja bażi–pendil jew pendil–quċċata) ikunu jistgħu jiġu definiti. — Il-linja li tiddefinixxi l-pendil pożittiv għandu jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba (medja ± SD). Il-punti li jifformaw il-linja bażi huma eskluži, iżda l-parti lineari tal-kurva tista' tinkludi l-quċċata jew l-ewwel punt tal-plateau. — Klassifikazzjoni pożittiva teħtieġ amplitudni tar-rispons, id-differenza bejn il-linja bażi u l-quċċata, ta' tal-anqas 20 % tal-valur massimali għall-istandard referenzjarju, E2 (jiġifieri 2000 RLU jew aktar meta l-valur tar-rispons massimali tal-istandards referenzjarji [E2] ikun aġġustat għal 10,000 RLU). — Jekk possibbli, valur tal-EC_{50} għandu jiġi kkalkolat għal kull sustanza kimika tat-test pożittiva.
Negattiv	L-RLU aġġustata medja għal konċentrazzjoni partikolari tkun fil-livell tal-valur medju tal-RLU tal-kontroll bid-DMSO flimkien ma' tliet darbiet id-devjazzjoni standard tal-RLU bid-DMSO jew aktar.
Inadegwata	*Data* li ma tistax tiġi interpretata bħala valida għall-wiri tal-preżenza jew tal-assenza tal-attività minħabba limitazzjonijiet kwalitattivi jew kwantitattivi kbar titqies inadegwata u ma tistax tintuża biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix pożittiva jew negattiva. Is-sustanzi kimiċi għandhom jerġgħu jiġu ttestjati.
ATTIVITÀ ANTAGONISTA	
Pożittiva	— Id-*data* dwar is-sustanza kimika tat-test tipproduċi kurva konċentrazzjoni rispons li tikkonsisti f'linja bażi, li tkun segwita minn pendil negattiv. — Il-linja li tiddefinixxi l-pendil negattiv għandu jkun fiha tal-anqas tliet punti bi żbarri ta' errur mhux imrikkba; punti li jifformaw il-linja bażi huma eskluži, iżda l-parti lineari tal-kurva tista' tinkludi l-ewwel punt tal-plateau. — Għandu jkun hemm tnaqqis ta' tal-anqas 20 % fl-attività mill-valur massimali għall-istandard referenzjarju, Ral/E2 (jiġifieri 8 000 RLU jew anqas meta l-valur tar-rispons massimali tal-istandard referenzjarju [Ral/E2] ikun aġġustat għal 10,000 RLU). — L-ogħla konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi tas-sustanza kimika tat-test għandhom ikunu ekwivalenti għal $1x10^{-5}$ M jew anqas. — Jekk possibbli, valur tal-IC_{50} għandu jiġi kkalkolat għal kull sustanza kimika tat-test pożittiva.
Negattiva	Il-punti tad-*data* kollha huma ogħla mill-valur tal-EC_{80} (80 % tar-rispons tal-E2, jew 8 000 RLUs), f'konċentrazzjonijiet anqas minn $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Inadegwata	Id-*data* li ma tistax tiġi interpretata bħala valida għall-wiri tal-preżenza jew tal-assenza tal-attività minħabba limitazzjonijiet kwalitattivi jew kwantitattivi kbar titqies inadegwata u ma tistax tintuża biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test hix pożittiva jew negattiva. Is-sustanza kimika għandha terġa' tiġi ttestjata.

40. Ir-riżultati pożittivi jiġu karatterizzati kemm mill-kobor tal-effett kif ukoll mill-konċentrazzjoni li fiha jseħħ l-effett, fejn possibbli. L-eżempji ta' *data* pożittiva, negattiva u inadegwata huma murija fil-Figuri 5 u 6.

Figura 5

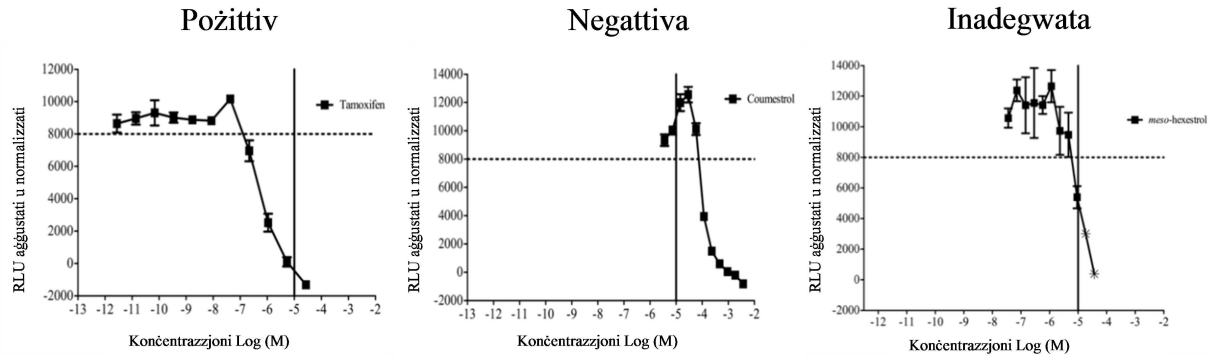
Eżempji ta' Agonisti: *Data* Pożittiva, Negattiva u Inadegwata



Linja ttikkjata tindika 20 % tar-rispons tal-E2, 2000 RLU aġġustati u normalizzati.

Figura 6

Eżempji ta' Antagonisti: *Data* Pożittiva, Negattiva u Inadegwata



Linja ttikkjata tindika 80 % tar-rispons tal-Ral/E2, 8 000 RLU aġġustati u normalizzati.

Linja solida tinidka 1,00 x 10-5 M. Biex rispons jitqies pożittiva, għandu jkun anqas mil-linja tat-8 000 RLU, u f'konċentrazzjonijiet ta' anqas minn 1,00 x 10-5M.

Il-konċentrazzjonijiet b'asterisk fil-graff mesoeżestrol jindikaw punteġġi ta' vijabbiltà ta' "2" jew aktar.

Ir-riżultati tat-test għall-mesoeżestrol huma meqjusa *data* inadegwata għaliex l-uniku rispons li hu anqas minn 8,000 RLU iseħħ f'1,00 x 10-5M.

41. Il-kalkoli tal-EC_{50} u tal-IC_{50} jistgħu jsiru bl-użu ta' Funzjoni Hill b'erba' parametri (ara l-protokoll tal-agonisti u l-protokoll tal-antagonisti għal aktar dettalji (7)). L-ilħuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà jindika li s-sistema qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe sessjoni partikolari tipproduċi *data* preċiża. Id-duplikazzjoni tar-riżultati tal-ewwel sessjoni hi l-aħjar garanzija li tkun ġiet prodotta *data* preċiża (ara l-paragrafu 19 tal-"KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER").

RAPPORT TAT-TEST

42. Ara l-paragrafu 20 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER".

DOKUMENTAZZJONI

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5 367-5 373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5 941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* Mol. *Toxicol.*,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol.*, 71(10):1 459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4 252-63.

(12) Geisinger, *et al*. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al*. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al*. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. u Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

Appendiċi 4

ASSAĠĠ TA' TRANSATTIVAZZJONI TAR-RIĊETTUR-A TAL-ESTROĠENU UMAN TRANSFETTAT B'MOD STABBLI GĦAD-DETEZZJONI TA' ATTIVITÀ AGONISTA U ANTAGONISTA TA' SUSTANZI KIMIĊI BL-UŻU TAL-LINJA TA' ĊELLOLI ERA CALUX

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. L-assaġġ tat-transattivazzjoni tal-ERα CALUX juża l-linja ta' ċelloli umana U2Os biex jindividwa attività agonista u antagonista estroġenika medjata permezz tar-riċettur alfa tal-estroġenu uman (hERα). L-istudju ta' validazzjoni tal-bijoassaġġ ERα CALUX transfettat b'mod stabbli minn BioDetection Systems BV (Amsterdam, in-Netherlands) wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ għall-iskop maħsub tiegħu (1). Il-linja ta' ċelloli ERα CALUX tesprimi ERα uman transfettat b'mod stabbli biss (2)(3).

2. Dan l-assaġġ hu mfassal b'mod speċifiku biex jindividwa transattivazzjoni medjata minn hERα billi jkejjel il-bijoluminexxenza bħala l-punt ta' tmiem. L-użu tal-bijoluminexxenza jintuża spiss fil-bijoassaġġi minħabba l-proporzjon għoli ta' sinjal għal storbju (4).

3. Konċentrazzjonijiet ta' fitoestrġenu ogħla minn 1 μM ġew rapportati li jattivaw b'mod eċċessiv il-ġene indikatur tal-luċiferaži, li jirriżulta f'luminexxenza medjata mhux minn riċettur (5) (6) (7). Għaldaqstant, konċentrazzjonijiet ogħla ta' fitoestroġeni jew ta' komposti simili oħra li jistgħu jattivaw b'mod eċċessiv l-espressjoni ta' luċiferaži, iridu jiġu eżaminati bir-reqqa f'assaġġi ta' transattivazzjoni tal-ER transfettati b'mod stabbli (ara l-Appendiċi 2).

4. Għandhom jinqraw "INTRODUZZJONI ĠENERALI" u "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. Il-bijoassaġġ jintuża biex jivvaluta l-irbit tal-ligand tal-ER u t-traslokazzjoni sussegwenti tal-kumpless riċettur-ligand għan-nukleu. Fin-nukleu, il-kumpless riċettur-ligand jillega elementi speċifiċi ta' rispons tad-DNA u jittransattiva ġene indikatur tal-luċiferaži tal-firefly, li jirriżulta f'espressjoni ċellolari miżjuda tal-enzima luċiferaži. Wara ż-żieda tas-substrat tal-luċiferaži, il-luċiferina, il-luċiferina tiġi trasformata fi prodott bijoluminexxenti. Id-dawl prodott faċilment jista' jiġi individwat u kwantifikat bl-użu ta' luminometru.

6. Is-sistema tat-test tuża ċelloli CALUX ERα transfettati b'mod stabbli. Iċ-ċelloli CALUX ERα oriġinaw mil-linja ta' ċelloli osteosarkoma osteoblastika umana U2OS. Iċ-ċelloli U2OS umani ġew transfettati b'mod stabbli bi 3xHRE-TATA-Luc u b'pSG5-neo-hERα bl-użu ta' metodu ta' kopreċipitazzjoni tal-fosfat tal-kalċju. Il-linja ta' ċelloli tal-U2OS intgħażlet bħala l-aħjar kandidat biex isservi bħala l-linja ta' ċelloli indikatur risponsiva tal-estroġenu (u ta' ormon ieħor ta' sterojde), fuq il-bażi tal-osservazzjoni li l-linja ta' ċelloli U2OS ftit li xejn uriet attività ta' riċettur endoġenu jew l-ebda attività affattu. L-assenza ta' riċetturi endoġeni ġiet ivvalutata bl-użu ta' plażmidi indikaturi tal-luċiferaži biss, li ma wrew ebda attività meta żdiedu l-ligandi tar-riċettur. Barra minn hekk, din il-linja ta' ċelloli sostniet risponsi b'saħħithom medjati bl-ormoni meta ġew introdotti b'mod tranżjenti r-riċetturi konjati (2) (3) (8).

7. L-ittestjar ta' sustanzi kimiċi għal attività estroġenika jew antiestroġenika bl-użu tal-linja ta' ċelloli CALUX ERα jinkludi sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u sessjonijiet komprensivi. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, jiġu determinati s-solubbiltà, iċ-ċitotossiċità u medda ta' konċentrazzjoni rfinuta ta' sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv. Matul is-sessjonijiet komprensivi, il-meded ta' konċentrazzjoni rfinuti tas-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati fil-bijoassaġġi ERα CALUX segwiti mill-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-agoniżmu jew għall-antagoniżmu.

8. Il-kriterji għall-interpretazzjoni tad-*data* huma deskritti fid-dettall fil-paragrafu 59. Fil-qosor, sustanza kimika tat-test titqies pożittiva għall-agoniżmu f'każ li tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test juru rispons li jkun ekwivalenti għal 10 % jew ogħla minn 10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju 17β-estradjol (PC_{10}). Sustanza kimika tat-test titqies pożittiva għall-antagoniżmu f'każ li tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test juru rispons li jkun ekwivalenti għal 80 % jew anqas minn 10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju tamossifen (PC_{80}).

PROĊEDURA

Linji ta' ċelloli

9. Il-linja ta' ċelloli trasferita b'mod stabbli U2OS ERα CALUX għandha tintuża għall-assaġġ. Il-linja ta' ċelloli tista' tinkiseb mingħand BioDetection Systems BV, Amsterdam, in-Netherlands bi ftehim ta' liċenzjar tekniku.

10. Għandhom jintużaw kolturi ta' ċelloli ħielsa minn mikoplażma biss. Il-lottijiet taċ-ċelloli użati għandhom ikunu ċċertifikati negattivi għall-kontaminazzjoni bil-mikoplażma, jew inkella għandu jsir test tal-mikoplażma qabel l-użu. Għandu jintuża RT-PCR (Reazzjoni Katina bil-Polimeraży f'Ħin Reali) għad-detezzjoni sensittiva ta' infezzjoni tal-mikoplażma (9).

Stabbiltà tal-linja ta' ċelloli

11. Biex jinżammu l-istabbiltà u l-integrità taċ-ċelloli CALUX, iċ-ċelloli għandhom jinħażnu f'nitroġenu likwidu (-80 ^{0}C). Wara li ċ-ċelloli jitħallew jinħallu biex tinbeda koltura ġdida, iċ-ċelloli għandhom jiġu subkolturati tal-anqas darbtejn qabel ma jintużaw għall-valutazzjoni tal-attività agonista u antagonista estroġenika tas-sustanzi kimiċi. Iċ-ċelloli ma għandhomx jiġu subkolturati għal aktar minn 30 passaġġ.

12. Biex tiġi ssorveljata l-istabbiltà tal-linja ta' ċelloli maż-żmien, ir-risponsività tas-sistema tat-test agonistika u antagonistika għandha tiġi verifikata bl-evalwazzjoni tal-EC_{50} jew tal-IC_{50} tal-istandard referenzjarju. Barra minn hekk, l-induzzjoni relattiva tal-kampjun tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kampjun tal-kontroll negattiv (NC) għandha tiġi ssorveljata. Ir-riżultati għandhom ikunu jaqblu mal-kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaġġ ERα CALUX agonistiku (Tabella 3C) jew antagonistiku (Tabella 4C). L-istandards referenzjarji, il-kontrolli pożittivi u dawk negattivi huma mogħtija fit-Tabella 1 u fit-Tabella 2 għall-modalità agonistika u dik antagonistika rispettivament.

Koltura taċ-Ċelloli u kundizzjonijiet tal-pjastrament

13. Iċ-ċelloli U2OS għandhom jiġu kolturati f'medium tat-tkabbir (DMEM/F12 (1:1) b'fenol aħmar bħala indikatur tal-pH, suppimentat b'serum bovin fetali (7,5 %), amminoaċidi mhux essenzjali (1 %), 10 Unitajiet/ml peniċillina, sterptomiċina u ġeneticina (G-418) bħala markatur tal-għażla). Iċ-ċelloli għandhom jitqiegħdu f'inkubatur tas-CO_2 (5 % CO_2) f'37 ^{0}C u f'100 % umdità. Meta ċ-ċelloli jilħqu konfluwenza ta' 85-95 %, iċ-ċelloli għandhom jiġu subkolturati jew jitħejjew għaż-żriegħ fi pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra. Fil-każ imsemmi l-aħħar, iċ-ċelloli għandhom jerġgħu jiġu sospiżi f'1x10^5 ċelloli/ml f'medium tal-assaġġ ħieles minn estroġenu (medium DMEM/F12 (1:1) mingħajr fenol aħmar, supplimentat b'serum bovin fetali trattat bil-Faħam Miksi bid-Dekstran (5 % v/v), b'amminoaċidi mhux essenzjali (1 % v/v), b'10 Units/ml ta' peniċillinau streptomiċina) u jiġu pjastrati fil-bwejriet tal-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (sospensjoni ta' 100 µl ċelloli omoġenizzati). Iċ-ċelloli għandhom jiġu inkubati minn qabel f'inkubatur tas-CO_2 (5 % CO_2, 37^{0}C, 100 % umdità) għal 24 siegħa qabel l-esponiment. L-oġġetti tal-plastik għandhom ikunu ħielsa minn estroġenu.

Kriterji ta' aċċettabbiltà

14. L-attivitajiet agonistiċi u antagonistiċi tas-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test jiġu ttestjati f'serje ta' testijiet. Serje ta' testijiet tikkonsisti f'massimu ta' sitt pjastri għall-mikrotitraġġ. Kull serje ta' testijiet fiha tal-anqas serje waħda sħiħa ta' dilwizzjonijiet ta' standard referenzjarju, kampjun tal-kontroll pożittiv, kampjun tal-kontroll negattiv u kontrolli b'solvent. Il-Figuri 1 u 2 jagħtu l-kompożizzjoni tal-pjastri għas-serje tat-testijiet agonistiċi u antagonistiċi.

15. Kull dilwizzjoni tal-istandards ta' refernza, tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-kontrolli b'solvent kollha, u tal-kontrolli pożittivi u negattivi għandha tiġi analizzata fi triplikat. Kull waħda mill-analiżijiet tat-triplikat għandha tissodisfa r-rekwiżiti mogħtija fit-Tabella 3A u fit-Tabella 4A.

16. Serje kompluta ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju (17β-estradjol għall-agoniżmu; tamossifen għall-antagoniżmu) titkejjel fl-ewwel pjastra f'kull serje ta' testijiet. Biex ikunu jistgħu jitqabblu r-riżultati tal-analiżi tal-ħames pjastri għall-mikrotitraġġ li jifdal bl-ewwel pjastra għall-mikrotitraġġ li fiha l-kurva konċentrazzjoni rispons sħiħa tal-istandard referenzjarju, il-pjastri kollha għandu jkun fihom tliet kampjuni tal-kontroll: kontroll b'solvent, l-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju ttestjat, u l-konċentrazzjoni approssimata tal-EC_{50} (agoniżmu) jew tal-IC_{50} (antagoniżmu) tal-istandard referenzjarju. Il-proporzjon tal-kampjuni tal-kontroll medji fl-ewwel pjastra u fil-ħames pjastri li jifdal għandu jissodisfa r-rekwiżiti kif mogħtija fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

17. Għal kull waħda mill-pjastri għall-mikrotitraġġ fi ħdan serje ta' testijiet, jiġi kkalkolat il-fattur-z (10). Il-fattur-z għandu jiġi kkalkolat bl-użu tar-risponsi fl-ogħla u fl-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Pjastra għall-mikrotitraġġ titqies valida f'każ li tkun tissodisfa r-rekwiżiti stipulati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

18. L-istandard referenzjarju għandu juri kurva doża-rispons sigmojde. L-EC_{50} jew l-IC_{50} miksub mir-rispons tas-serje ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju għandu jissodisfa r-rekwiżiti kif indikati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

19. Kull serje ta' testijiet għandu jkun fiha kampjun tal-kontroll pożittiv u kampjun tal-kontroll negattiv. L-induzzjoni relattiva kkalkolata tal-kampjun tal-kontroll kemm pożittiv kif ukoll dak negattiv għandha tissodisfa r-rekwiżiti kif indikati fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

20. Matul il-kejlijiet kollha, il-fattur ta' induzzjoni tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju għandu jitkejjel bid-diviżjoni tal-ogħla rispons medju tal-unità tad-dawl relattiva (RLU) tal-istandard referenzjarju 17β-estradjol bir-rispons medju tal-RLU tal-kontroll b'solvent ta' referenza. Dan il-fattur ta' induzzjoni għandu jissodisfa r-rekwiżiti minimi għall-induzzjoni tad-drabi kif indikat fit-Tabella 3C (agoniżmu) jew fit-Tabella 4C (antagoniżmu).

21. Pjastri għall-mikrotitraġġ li jissodisfaw dawn il-kriterji ta' aċċettazzjoni msemmija hawn fuq kollha biss jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test.

22. Il-kriterji ta' aċċettazzjoni huma applikabbli kemm għas-sessjonijiet ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll għal dawk komprensivi.

Tabella 1

Konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju, tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kontroll negattiv (NC) għall-bijoassaġġ agonistiku CALUX.

	Sustanza	CAS RN	Medda tat-test (M)
Standard ta' referenza	17β-estradjol	50-28-2	$1*10^{-13}$ - $1*10^{-10}$
Kontroll pożittiv (PC)	17α-metiltestosteron	58-18-4	$3*10^{-6}$
Kontroll Negattiv (NC)	kortikosteron	50-22-6	$1*10^{-8}$

Tabella 2

Konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju, tal-kontroll pożittiv (PC) u tal-kontroll negattiv (NC) għall-bijoassaġġ antagonistiku CALUX.

	Sustanza	CAS RN	Medda tat-test (M)
Standard ta' referenza	tamossifen	10540-29-1	$3*10^{-9}$ - $1*10^{-5}$
Kontroll pożittiv (PC)	4-idrossitamossifen	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Kontroll Negattiv (NC)	resveratrol	501-36-0	$1*10^{-5}$

Tabella 3

Kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaġġ agonistiku ERα CALUX

A - kampjuni individwali fuq pjastra		Kriterji
1	% SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal NC, PC, kull dilwizzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tal-istandard referenzjarju, ħlief C0)	< 15 %
2	% SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal standard referenzjarju u għal kontrolli b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (C0, SC))	< 30 %
3	Tnixxija massima ta' LDH, bħala kejl ta' ċitotossiċità	< 120 %
B - fi ħdan pjastra waħda għall-mikrotitraġġ		
4	Proporzjon tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju (C0; pjastra 1) u l-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (SC; pjastri 2 sa x)	0,5 sa 2,0
5	Proporzjon tal-appr. EC50 u l-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastra 1 u l-appr. EC50 u l-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastri 2 sa x (C4, C8)	0,70 sa 1,30
6	Fattur-Z għal kull pjastra	>0,6
C - fi ħdan sensiela waħda ta' analiżijiet (il-pjastri kollha fi ħdan sensiela waħda)		
7	Kurva sigmojde tal-istandard referenzjarju	Iva (17ß-estradjol)
8	standard referenzjarju tal-medda ta' EC50 ta' 17ß-estradjol	4*10-12 – 4*10-11 M
9	Induzzjoni minima tad-drabi tal-ogħla konċentrazzjoni ta' 17ß-estradjol, fir-rigward tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju.	5
10	Induzzjoni relattiva (%) PC	> 30 %
11	Induzzjoni relattiva (%) NC	<10 %

Appr.: approssimattiv; PC: kontroll pożittiv; NC: kontroll negattiv; SC: kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test; C0: kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju; SD: devjazzjoni standard; LDH: lattatdeidroġenaži

Tabella 4

Kriterji ta' aċċettazzjoni għall-bijoassaġġ antagonistiku ERα CALUX

A - kampjuni individwali fuq pjastra		**Kriterji**
1	% SD massimu tal-bwejriet triplikati (għal NC, PC, kull dilwizzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tal-istandard referenzjarju, kontroll b'solvent (C0))	< 15 %
2	% SD massimu ta' bwejriet triplikati (għall-kontroll b'veikolu (VC) u l-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju (C8))	< 30 %
3	Tnixxija massima ta' LDH, bħala kejl ta' ċitotossiċità	< 120 %
B - fi ħdan pjastra waħda għall-mikrotitraġġ		
4	Proporzjon tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju (C0; pjastra 1) u l-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (SC; pjastri 2 sa x)	0,70 sa 1,30
5	Proporzjon tal-appr. konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju tal-IC50 fil-pjastra 1 u l-appr. konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju tal-IC50 fil-pjastri 2 sa x (C4, C8)	0,70 sa 1,30
6	Proporzjon tal-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastra 1 u l-ogħla konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju fil-pjastri 2 sa x (C8)	0,50 sa 2,0
7	Fattur-Z għal kull pjastra	>0,6
C - fi ħdan sensiela waħda ta' analiżijiet (il-pjastri kollha fi ħdan sensiela waħda)		
8	Kurva sigmojde tal-istandard referenzjarju	Iva (Tamossifen)
9	standard referenzjarju tal-medda ta' IC50 (Tamossifen)	1*10-8 - 1*10-7 M
10	Induzzjoni minima t'a drabi tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju, fir-rigward tal-ogħla konċentrazzjoni ta' Tamossifen.	2,5
11	Induzzjoni relattiva (%) PC	<70 %
12	Induzzjoni relattiva (%) NC	>85 %

Appr.: approssimattiv; PC: kontroll pożittiv; NC: kontroll negattiv; VC: kontroll b'veikolu (kontroll b'solvent mingħajr konċentrazzjoni fissa ta' standard referenzjarju agonist); SC: kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test; C0: kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju; SD: devjazzjoni standard; LDH: lattatdeidroġenaži

Kontroll b'solvent/b'veikolu, standards referenzjarji, kontrolli pożittivi, kontrolli negattivi

23. Kemm għas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll għas-sessjonijiet komprensivi, għandhom jintużaw l-istess kontroll b'solvent/b'veikolu, standards ta' referenza, kontrolli pożittivi u kontrolli negattivi. Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni ta' standards referenzjarji, ta' kontrolli pożittivi u ta' kontrolli negattivi għandha tkun l-istess.

Kontrolli tas-solvent

24. Is-solvent użat biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti għandu jiġi ttestjat bħala kontroll b'solvent. Dimetilsulfossidu (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) intuża bħala veikolu matul il-validazzjoni tal-bijoassaġġ ERα CALUX. Jekk jintuża solvent ieħor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu. Jekk jogħġbok kun af li l-kontroll b'solvent għal studji antagonistiċi fih konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol (konċentrazzjoni approssimattiva tal-EC_{50}) Biex jiġi ttestjat is-solvent użat għall-istudji antagonistiċi, għandu jitħejja u jiġi ttestjat kontroll b'veikolu.

Kontroll b'veikolu (antagoniżmu)

25. Għall-ittestjar tal-antagoniżmu, il-medium tal-assaġġ hu supplimentat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol (konċentrazzjoni approssimattiva tal-EC_{50}). Biex jiġi ttestjat is-solvent użat għad-dissoluzzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-antagoniżmu, għandu jitħejja medium tal-assaġġ mingħajr konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol. Dan il-kampjun tal-kontroll hu indikat bħala l-kontroll b'veikolu. Dimetilsulfossidu (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) intuża bħala veikolu matul il-validazzjoni tal-bijoassaġġ ERα CALUX. Jekk jintuża solvent ieħor li mhuwiex DMSO, l-istandards referenzjarji, il-kontrolli u s-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandhom jiġu ttestjati fl-istess veikolu.

Standards ta' referenza

26. L-istandard referenzjarju agonistiku hu 17β-estradjol (Tabella 1). L-istandards referenzjarji jinkludu sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' tmien konċentrazzjonijiet ta' 17β-estradjol ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. L-istandard referenzjarju antagonistiku hu tamossifen (Tabella 2). L-istandards referenzjarji jinkludu sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' tmien konċentrazzjonijiet ta' tamossifen ($3*10^{-9}$, $1*10^{-8}$, $3*10^{-8}$, $1*10^{-7}$, $3*10^{-7}$, $1*10^{-6}$, $3*10^{-6}$, $1*10^{-5}$ M). Kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-istandard referenzjarju antagonistiku tiġi koinkubata b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17β-estradjol ($3*10^{-12}$ M).

Kontroll pożittiv

28. Il-kontroll pożittiv għall-istudji agonistiċi hu 17α-metiltestosteron (Tabella 1).

29. Il-kontroll pożittiv għall-istudji antagonistiċi hu 4-idrossitamossifen (Tabella 2). Il-kontroll pożittiv antagonistiku jiġi koinkubat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17β-estradjol ($3*10^{-12}$ M).

Kontroll negattiv

30. Il-kontroll negattiv għall-istudji agonistiċi hu kortikosteron (Tabella 1).

31. Il-kontroll negattiv għall-istudji antagonistiċi hu resveratrol (Tabella 2). Il-kontroll negattiv antagonistiku jiġi koinkubat b'konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17β-estradjol ($3*10^{-12}$ M).

Wiri tal-proficjenza tal-laboratorju (ara l-paragrafu 14 u t-Tabelli 3 u 4 f"KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER" ta' dan il-metodu ta' ttestjar)

Veikolu

32. Is-solvent użat biex jiġu dissolti s-sustanzi kimiċi tat-test għandu jissolubilizza s-sustanza kimika tat-test għalkollox u għandu jkun jitħallat mal-medium taċ-ċellola. DMSO, ilma u etanol (purità ta' 95 % sa 100 %) huma solventi xierqa. F'każ li jintuża DMSO bħala solvent, il-konċentrazzjoni massima ta' DMSO matul l-inkubazzjoni ma għandhiex taqbeż il-1 % (v/v). Qabel l-użu, is-solvent għandu jiġi ttestjat għall-assenza ta' ċitotossiċità u ta' interferenza mal-prestazzjoni tal-assaġġi.

Preparazzjoni tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test

33. L-istandards referenzjarji, il-kontrolli pożittivi, il-kontrolli negattivi u s-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti fid-DMSO 100 % (jew f'solvent xieraq). Imbagħad għandhom jitħejjew dilwizzjonijiet (serjali) xierqa fl-istess solvent. Qabel ma jiġu dissolti, is-sustanzi kollha għandhom jitħallew jekwilibraw għal temperatura ambjentali. Soluzzjonijiet ewlenin imħejjija friski tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test ma għandux ikollhom preċipitat jew dardir notevoli. L-istokks ta' standards referenzjarji u ta' kontroll jistgħu jitħejjew bl-ingrossa. Is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jitħejjew friski qabel kull esperiment. Id-dilwizzjonijiet finali tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jitħejjew friski għal kull esperiment u jintużaw fi żmien 24 siegħa mit-tħejjija.

Is-solubbiltà, iċ-ċitotossiċità u s-sejbien tal-medda.

34. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, tiġi determinata s-solubbiltà tas-sustanzi kimiċi tat-test fis-solvent tal-għażla. Titħejja konċentrazzjoni stokk massima ta' 0,1 M. F'każ li din il-konċentrazzjoni turi problemi ta' solubbiltà, għandhom jitħejjew anqas soluzzjonijiet ta' stokk sakemm is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu solubilizzati għalkollox. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, jiġu ttestjati dilwizzjonijiet serjali ta' 1:10 tas-sustanza kimika tat-test. Il-konċentrazzjoni massima tal-assaġġ għall-ittestjar tal-agonisti jew tal-antagonisti hi ta' 1 mM. Wara l-iskrinjar ta' qabel, tinkiseb medda ta' konċentrazzjoni rfinata xierqa għas-sustanzi kimiċi tat-test li għandha tiġi ttestjata matul is-sessjonijiet komprensivi. Id-dilwizzjonijiet użati għall-ittestjar komprensiv għandhom ikunu ta' 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x u 3000x.

35. L-ittestjar taċ-ċitotossiċità hu inklużi fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (11). L-ittestjar taċ-ċitotossiċità hu inkorporat kemm fis-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar kif ukoll fis-sessjonijiet komprensivi. Il-metodu użat għall-valutazzjoni taċ-ċitotossiċità matul il-validazzjoni tal-bijoassaġġ ERα CALUX kien it-test tat-tnixxija tal-lattatdeidroġenaži (LDH) flimkien ma' spezzjoni viżwali kwalitattiva taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 4.1) wara l-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test. Madankollu, jistgħu jintużaw metodi kwantitattivi oħra għad-determinazzjoni taċ-ċitotossiċità (eż. assaġġ kalorimetriku bbażat fuq it-tetrażolju (MTT) jew bijoassaġġ CALUX taċ-ċitotossiċità). B'mod ġenerali, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test li juru tnaqqis akbar minn 20 % fil-vijabbiltà taċ-ċelloli jitqiesu ċitotossiċi u għalhekk ma jistgħux jintużaw għall-evalwazzjoni tad-*data*. Fir-rigward tal-assaġġ tat-tnixxija tal-LDG, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test titqies ċitotissika meta l-perċentwal tat-tnixxija tal-LDH ikun ogħla minn 120 %.

Esponiment għas-sustanza kimika tat-test u organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ

36. Wara t-tripsinizzazzjoni ta' flask konfluwenti ta' ċelloli kkolturati, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'$1x10^5$ ċelloli /ml f'medium tal-assaġġ ħieles minn estroġenu. Mitt µl f'ċelloli sospiżi mill-ġdid jiġu pjastrati fil-bwejriet interni ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra. Il-bwejriet ta' barra jimtlew b'200 µl ta' Salina Baferjata tal-Fosfat (PBS) (ara l-Figuri 1 u 2). Iċ-ċelloli pjastrati jiġu inkubati minn qabel għal 24 siegħa f'inkubatur tas-CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % umdità).

37. Wara l-inkubazzjoni minn qabel, il-pjastri jiġu spezzjonati għal ċitotossiċità viżwali (ara l-Appendiċi 4.1) għal kontaminazzjoni u għal konfluwenza. Huma biss pjastri li ma juru ebda ċitotossiċità, kontaminazzjoni u li jkollhom tal-anqas konfluwenza ta' 85 % li jintużaw għall-ittestjar. Il-medium għall-bwejriet interni jitneħħa bil-galbu u jiġi sostitwit b'200 µl medium tal-assaġġ ħieles mill-estroġenu li jkun fih serje ta' dilwizzjonijiet xierqa tal-istandards referenzjarji, tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-kontrolli pożittivi, tal-kontrolli negattivi u tal-kontrollib'solvent

(Tabella 5: studji agonisti; Tabella 6: studji antagonisti). L-istandards referenzjarji, is-sustanzi kimiċi tat-test, il-kontrolli pożittivi, il-kontrolli negattivi u l-kontrolli b'solvent kollha jiġu ttestjati fi triplikat. Fil-Figura 1 tingħata t-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar tal-agonisti. Fil-Figura 2 tingħata t-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar tal-antagonisti. It-tifsila tal-pjastra għall-ittestjar ta' qabel l-iskrinjar u għall-ittestjar komprensiv hi identika. Għall-ittestjar tal-antagonisti, il-bwejriet interni kollha, ħlief għall-bwejriet tal-kontroll b'veikolu (VC), ikun fihom ukoll konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol ($3*10^{-12}$ M). Kun af li l-istandards referenzjarji C8 u C4 għandhom jiżdiedu ma' kull pjastra tat-TC.

38. Wara l-esponiment taċ-ċelloli għas-sustanzi kimiċi kollha, il-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra għandhom jiġu inkubati għal 24 siegħa oħra f'inkubatur tas-CO_2 (5 % CO_2, 37 °C, 100 % umdità).

Figura 1

Tifsila tal-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra għall-iskrinjar ta' qabel u għall-valutazzjoni tal-effett agonistiku.

Pjastra 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NC	
H												

Pjastri sussegwenti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = solvent tal-istandard referenzjarju.

C(1-8) = serje ta' dilwizzjonijiet (1-8, konċentrazzjonijiet baxxi sa għoljin) tal-istandard referenzjarju.

PC = kontroll pożittiv.

NC = kontroll negattiv.

TCx-(1-8) = dilwizzjonijiet (1-8, konċentrazzjonijiet baxxi sa għoljin) tas-sustanza kimika tat-test għas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u għall-valutazzjoni tal-effett agonistiku tas-sustanza kimika tat-test x.

SC = kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (idealment l-istess solvent bħal f'C0, iżda jista' jkun minn lott ieħor).

Ċelloli griżi: = Bwejriet ta' barra, mimlija b'200 µl PBS.

Figura 2

Tifsila tal-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra għall-iskrinjar antagonistiku ta' qabel u għall-valutazzjoni tal-effett antagonistiku.

Pjastra 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VC	
E		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
F		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
G		NC	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PC	
H												

Pjastri sussegwenti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (mass)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (mass)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (mass)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (mass)	
H												

C0 = solvent tal-istandard referenzjarju.

C(1-8) = serje ta' dilwizzjonijiet (1-8, konċentrazzjonijiet baxxi sa għoljin) tal-istandard referenzjarju.

NC = kontroll negattiv.

PC = kontroll pożittiv.

TCx-(1-8) = dilwizzjonijiet (1-8, konċentrazzjonijiet baxxi sa għoljin) tas-sustanza kimika tat-test għas-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar u għall-valutazzjoni tal-effett agonistiku tas-sustanza kimika tat-test x.

SC = kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test (idealment l-istess solvent bħal f'C0, iżda jista' jkun minn lott ieħor).

VC = kontroll b'veikolu (kontroll b'solvent mingħajr konċentrazzjoni fissa ta' standard referenzjarju agonist 17β-estradjol).

Ċelloli griżi: = Bwejriet ta' barra, mimlija b'200 µl PBS.

Nota: il-bwejriet interni kollha, ħlief għall-bwejriet tal-kontroll b'veikolu (VC), ikun fihom ukoll konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonist 17β-estradjol (3,0*10-12 M)

Kejl tal-luminexxenza

39. Il-kejl tal-luminexxenza hu deskritt fid-dettall fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (10). Il-medium mill-bwejriet għandu jitneħħa u ċ-ċelloli għandhom jiġu liżati wara 24 siegħa inkubazzjoni biex il-membrana taċ-ċelloli tinfetaħ u tkun tista' titkejjel l-attività tal-luċiferaži.

40. Għall-kejl tal-luminexxenza, din il-proċedura teħtieġ luminometru mgħammar b'2 injetturi. Ir-reazzjoni tal-luċiferaži tinbeda b'injezzjoni tal-substrat luċiferina. Ir-reazzjoni titwaqqaf biż-żieda ta' 0,2 M NaOH. Ir-reazzjoni titwaqqaf biex tipprevjeni l-ġarr tal-luminexxenza minn bwejra għall-oħra.

41. Id-dawl emess minn kull bwejra jiġi espress bħala Unitajiet tad-Dawl Relattivi (RLUs) għal kull bwejra.

Sessjoni ta' qabel l-iskrinjar

42. Ir-riżultati tal-analiżi ta' qabel l-iskrinjar jintużaw biex tiġi determinata medda ta' konċentrazzjoni rfinuta ta' sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv. L-evalwazzjoni tar-riżultati tal-analiżi ta' qabel l-iskrinjar u d-determinazzjoni tal-medda ta' konċentrazzjoni rfinuta tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar komprensiv hi deskritta fil-fond fil-protokoll tal-assaġġ tal-agonisti u tal-antagonisti (10). Hawnhekk jingħata sommarju qasir tal-proċeduri għad-determinazzjoni tal-medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-ittestjar tal-agonisti u tal-antagonisti. Ara t-Tabelli 5 u 6 għal gwida dwar it-tifsila tad-dilwizzjoni serjali.

L-għażla tal-konċentrazzjonijiet għall-valutazzjoni tal-effetti agonistiċi

43. Matul is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu ttestjati bl-użu tas-sensiliet ta' dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabelli 5 (agoniżmu) u 6 (antagoniżmu). Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom jiġu ttestjati fi bwejriet triplikati skont it-tifsila tal-pjastra kif indikata fil-Figura 1 (agoniżmu) jew 2 (antagoniżmu).

44. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabella 3) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerġgħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje sħiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje sħaħ tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerġgħu jiġu analizzati.

45. Il-meded ta' konċentrazzjoni inizjali tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu aġġustati u s-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha tiġi ripetuta f'każ:

— li tiġi osservata ċitotossiċità. Il-proċedura ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir b'konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

— l-iskrinjar minn qabel tas-sustanza kimika tat-test ma jurix kurva ta' doża-rispons sħiħa għaliex il-konċentrazzjonijiet ittestjati jiġġeneraw induzzjoni massima. Is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir billi jintużaw konċentrazzjonijiet inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

46. Meta jiġi osservat rispons validu relatat mad-doża, għandha tingħażel (l-anqas) konċentrazzjoni li fiha tiġi osservata induzzjoni massima u li ma turix ċitotossiċità. L-oġħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi, għandha tkun 3 darbiet din il-konċentrazzjoni magħżula.

47. Serje sħiħa rfinuta ta' dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha titħejja bl-istadji tad-dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabella 5, billi tibda mill-oġħla konċentrazzjoni kif determinata hawn fuq.

48. Sustanza kimika tat-test li ma twassalx għal xi effett agonistiku għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi billi tibda mill-oġħla konċentrazzjoni mhux tossika identifikata matul l-iskrinjar ta' qabel.

L-għażla tal-konċentrazzjonijiet għall-valutazzjoni tal-effetti antagonistiċi

49. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabella 4) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerġgħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje sħiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje sħaħ tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerġgħu jiġu analizzati.

50. Il-meded ta' konċentrazzjoni inizjali tas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu aġġustati u s-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha tiġi ripetuta f'każ:

— li tiġi osservata ċitotossiċità. Il-proċedura ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir b'konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

— l-iskrinjar minn qabel tas-sustanza kimika tat-test ma jurix kurva ta' doża-rispons sħiħa għaliex il-konċentrazzjonijiet ittestjati jiġġeneraw inibizzjoni massima. Is-sessjoni ta' qabel l-iskrinjar għandha terġa' ssir billi jintużaw konċentrazzjonijiet inferjuri tas-sustanza kimika tat-test.

51. Meta jinstab rispons validu relatat mad-doża, għandha tingħażel (l-anqas) konċentrazzjoni li fiha tiġi osservata inibizzjoni massima u li ma turix ċitotossiċità. L-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata fis-sessjonijiet komprensivi, għandha tkun tliet darbiet din il-konċentrazzjoni magħżula.

52. Serje sħiħa rfinata ta' dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha titħejja bl-istadji tad-dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabella 6, billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni kif determinata hawn fuq.

53. Is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jwasslux għal xi effett antagonistiku għandhom jiġu ttestjati fis-sessjonijiet komprensivi billi tibda mill-ogħla konċentrazzjoni mhux tossika ttestjata matul l-iskrinjar ta' qabel.

Sessjonijiet komprensivi

54. Wara l-għażla tal-meded ta' konċentrazzjonijiet irfinuti, is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jiġu ttestjati b'mod komprensiv bl-użu tas-sensiliet ta' dilwizzjonijiet kif indikati fit-Tabelli 5 (agoniżmu) u 6 (antagoniżmu). Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom jiġu ttestjati fi bwejriet triplikati skont it-tifsila tal-pjastra kif indikata fil-Figura 1 (agoniżmu) jew 2 (antagoniżmu).

55. Huma biss ir-riżultati tal-analiżi li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni (Tabelli 3 u 4) li jitqiesu validi u jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tar-rispons tas-sustanzi kimiċi tat-test. F'każ li pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ f'sensiela ta' analiżi tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, il-pjastri rispettivi għall-mikrotitraġġ għandhom jerġgħu jiġu analizzati. F'każ li l-ewwel pjastra li jkun fiha s-serje sħiħ ta' dilwizzjonijiet tal-istandard referenzjarju tonqos milli tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, is-serje sħaħ tat-test (sitt pjastri) ikollhom jerġgħu jiġu analizzati.

Tabella 5

Il-konċentrazzjoni u d-dilwizzjonijiet tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli u tas-sustanzi kimiċi tat-test użati għall-ittestjar tal-agonisti

Referenza 17β-estradjol		TCx - sessjoni ta' qabel l-iskrinjar		TCx - sessjoni komprensiva		Kontrolli	
konċ. (M)		dilwizzjoni		dilwizzjoni		konċ. (M)	
C0	0	TCx-1	10,000,000 x	TCx-1	3,000 x	PC	$3*10^{-6}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1,000,000 x	TCx-2	1,000 x	NC	$1*10^{-8}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100,000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10,000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1,000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx - sustanza kimika tat-test x
PC - kontroll pożittiv (17α-metiltestosteron)
NC - kontroll negattiv (kortikosteron)
C0 - kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju
SC - kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test

Tabella 6

Il-konċentrazzjoni u d-dilwizzjonijiet tal-istandards referenzjarji, tal-kontrolli u tas-sustanzi kimiċi tat-test użati għall-ittestjar tal-antagonisti

Referenza tamossifen		TCx - sessjoni ta' qabel l-iskrinjar		TCx - sessjoni komprensiva		Kontrolli	
konċ. (M)		dilwizzjoni		dilwizzjoni		konċ. (M)	
C0	0	TCx-1	10,000,000 x	TCx-1	3,000 x	PC	$1*10^{-9}$
C1	$3*10^{-9}$	TCx-2	1,000,000 x	TCx-2	1,000 x	NC	$1*10^{-5}$
C2	$1*10^{-8}$	TCx-3	100,000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-8}$	TCx-4	10,000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1*10^{-7}$	TCx-5	1,000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Agonist supplimentat**	
C6	$1*10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**konċ. (M)**	
C7	$3*10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17β-estradjol	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-5}$						

TCx - sustanza kimika tat-test x
PC - kontroll pożittiv (4-idrossitamossifen)
NC - kontroll negattiv (resveratrol)
C0 - kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju
SC - kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test
VC - il-kontroll b'veikolu (ma fihx konċentrazzjoni fissa tal-istandard referenzjarju agonistiku 17β-estradjol ($3,0*10^{-12}$ M)

Il-ġbir tad-*data* u l-analiżi tad-*data*

56. Wara s-sessjonijiet ta' skrinjar ta' qabel u komprensivi, għandhom jiġu determinati l-EC_{10}, l-EC_{50}, il-PC_{10}, il-PC_{50} u l-induzzjoni massima (TCx_{max}) ta' sustanza kimika tat-test għall-ittestjar agonistiku. Għall-ittestjar antagonistiku, għandhom jiġu kkalkolati l-IC_{20}, l-IC_{50}, il-PC_{80}, il-PC_{50} u l-induzzjoni minima (TCx_{min}). Fil-Figuri 3 (agoniżmu) u 4 (antagoniżmu) tingħata rappreżentazzjoni grafika ta' dawn il-parametri. Il-parametri meħtieġa huma kkalkolati fuq il-bażi tal-induzzjoni relattiva ta' kull sustanza kimika tat-test (relattiva għall-induzzjoni massima tal-istandard referenzjarju (=100 %)). Ir-rigressjoni mhux lineari (pendil varjabbli, 4 parametri) għandha tintuża għall-evalwazzjoni tad-*data* skont l-ekwazzjoni li ġejja:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope)})}$$

Fejn:

X = Log tad-doża jew tal-konċentrazzjoni

Y = Rispons (induzzjoni relattiva (%))

Quċċata = Induzzjoni massima (%)

Qiegħ = Induzzjoni minima (%)

$LogEC_{50}$ = Log tal-konċentrazzjoni li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu

HillSlope = Il-fattur tal-pendil jew il-pendil ta' Hill

57. Id-*data* mhux proċessata mil-luminometru, espressa bħala Unitajiet tad-Dawl Relattivi (RLUs), għandha tiġi trasferita għall-ispreadsheet tal-analiżi tad-*data* mfassla għas-sessjonijiet ta' qabel l-iskrinjar u komprensivi. Id-*data* mhux proċessata għandha tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni kif indikati fit-Tabelli 3A u 3B (agoniżmu) jew 4A u 4B (antagoniżmu). Fil-każ li d-*data* mhux proċessata tissodisfa l-kriterji ta' aċċettazzjoni, jitwettqu l-istadji li ġejjin tal-kalkolu biex jiġu determinati l-parametri meħtieġa:

Agoniżmu

— Naqqas l-RLU medja tal-kontroll b'solvent tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tal-istandards referenzjarji.

— Naqqas l-RLU medja għall-kontroll b'solvent tas-sustanza kimika tat-test minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tas-sustanzi kimiċi tat-test.

— Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Issettja l-induzzjoni tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju f'100 %.

— Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju bħala 100 %.

— Evalwa r-riżultati tal-analiżi skont rigressjoni mhux lineari (pendil varjabbli, erba' parametri).

— Iddetermina l-EC_{50} u l-EC_{10} tal-istandard referenzjarju.

— Iddetermina l-EC_{50} u l-EC_{10} tas-sustanzi kimiċi tat-test.

— Iddetermina l-induzzjoni relattiva massima tas-sustanza kimika tat-test (TC_{max}).

— Iddetermina l-PC_{10} u l-PC_{50} tas-sustanzi kimiċi tat-test.

Għas-sustanzi kimiċi tat-test, kurva ta' doża-rispons sħiħa mhux dejjem tkun tista' tinkiseb minħabba, eż., problemi ta' ċitotossiċità jew ta' solubbiltà. B'hekk, l-EC_{50}, l-EC_{10} u l-PC_{50} ma jkunux jistgħu jiġu determinati. F'dan, il-każ, il-PC_{10} u t-TC_{max} biss ikunu jistgħu jiġu determinati.

Antagoniżmu

— Naqqas l-RLU medja tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tal-istandards referenzjarji.

— Naqqas l-RLU medja tal-ogħla konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju minn kull *data* tal-analiżi mhux proċessata tas-sustanzi kimiċi tat-test.

— Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju. Issettja l-induzzjoni tal-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju f'100 %.

— Ikkalkola l-induzzjoni relattiva ta' kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-anqas konċentrazzjoni tal-istandard referenzjarju bħala 100 %.

— Evalwa r-riżultati tal-analiżi skont rigressjoni mhux lineari (pendil varjabbli, erba' parametri).

— Iddetermina l-IC_{50} u l-IC_{20} tal-istandard referenzjarju.

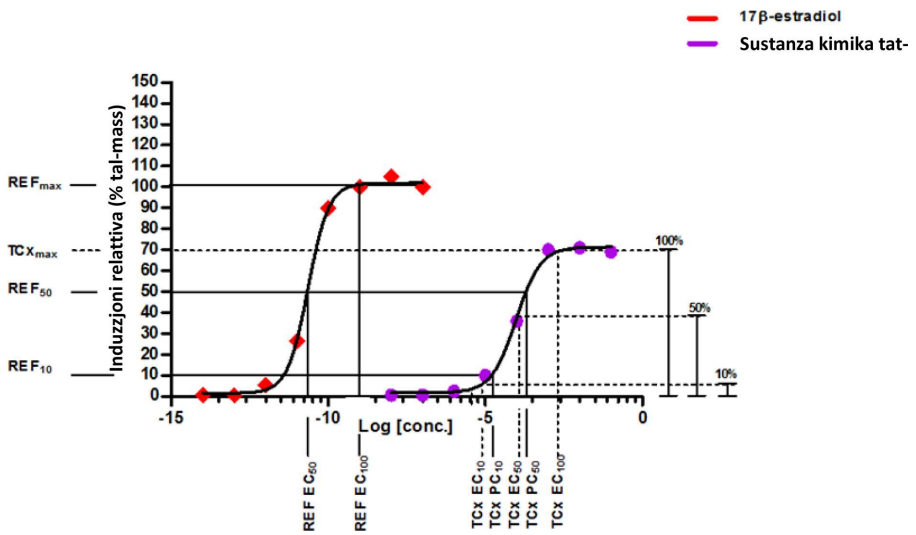
— Iddetermina l-IC_{50} u l-IC_{20} tas-sustanzi kimiċi tat-test.

— Iddetermina l-induzzjoni relattiva minima tas-sustanza kimika tat-test (TC_{min}).

— Iddetermina l-PC_{80} u l-PC_{50} tas-sustanzi kimiċi tat-test.

Figura 3

Ħarsa ġenerali lejn il-parametri determinati fl-assaġġ tal-agonisti



EC_{10} = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 10 % tar-rispons massimu tagħha.

EC_{50} = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu tagħha.

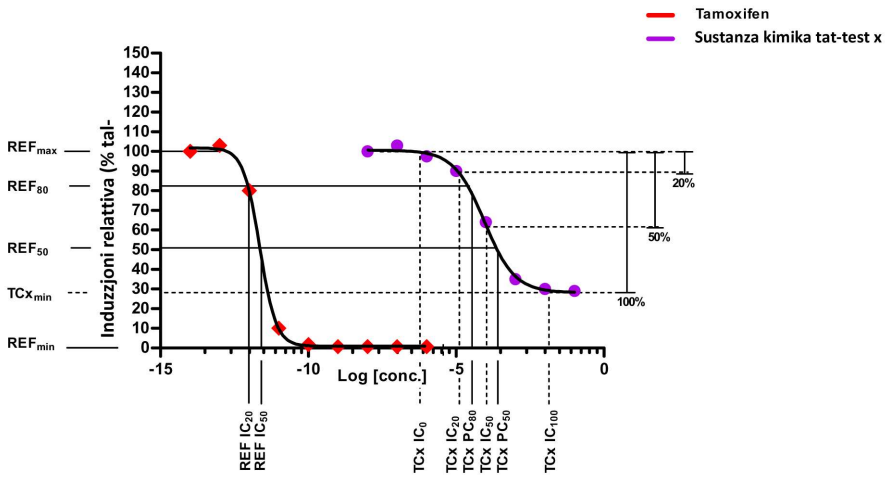
PC_{10} = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-EC_{10} tal-istandard referenzjarju.

PC_{50} = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-EC_{50} tal-istandard referenzjarju.

TCx_{max} = l-induzzjoni relattiva massima tas-sustanza kimika tat-test.

Figura 4

Ħarsa ġenerali lejn il-parametri determinati fl-assaġġ tal-antagonisti



IC20 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 80 % tar-rispons massimu tagħha (inibizzjoni ta' 20 %).

IC50 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza li fiha jiġi osservat 50 % tar-rispons massimu tagħha (inibizzjoni ta' 50 %).

PC80 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-IC20 tal-istandard referenzjarju.

PC50 = il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li fiha r-rispons tagħha jkun daqs l-IC50 tal-istandard referenzjarju.

TCxmin = l-induzzjoni relattiva minima tas-sustanza kimika tat-test.Għas-sustanzi kimiċi tat-test, kurva ta' doża-rispons sħiħa mhux dejjem tkun tista' tinkiseb minħabba, eż., problemi ta' ċitotossiċità jew ta' solubbiltà. B'hekk, l-IC_{50}, l-IC_{20} u l-PC_{50} ma jkunux jistgħu jiġu determinati. F'dan, il-każ, il-PC_{20} u t-TC_{min} biss ikunu jistgħu jiġu determinati.

58. Ir-riżultati għandhom ikunu bbażati fuq żewġ (jew tliet) sessjonijiet indipendenti. Jekk żewġ sessjonijiet jagħtu riżultati komparabbli u, għalhekk, riproduċibbli, ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Biex ikunu aċċettabbli, ir-riżultati għandhom:

— Jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (ara l-paragrafi 14-22 dwar il-Kriterji ta' aċċettabbiltà),

— Ikunu riproduċibbli.

Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data*

59. Għall-interpretazzjoni tad-*data* u d-deċiżjoni dwar jekk sustanza kimika tat-test titqiesx pożittiva jew negattiva, għandhom jintużaw il-kriterji li ġejjin:

Agoniżmu

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **pożittiva** f'każ li:

1 It-TC_{max} tkun ekwivalenti għal 10 % jew aktar tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF_{10}).

2 Tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF_{10} jew aktar minnha.

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **negattiva** f'każ li:

1 It-TCmax ma taqbiżx l-10 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF10).

2 Anqas minn żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF10 jew aktar minnha.

Antagoniżmu

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **pożittiva** f'każ li:

1 It-TCmin tkun ekwivalenti għal 80 % jew anqas tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF80 = inibizzjoni ta' 20 %).

2 Tal-anqas 2 konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF80 jew anqas minnha.

Għal kull sessjoni komprensiva, sustanza kimika tat-test titqies **negattiva** f'każ li:

1 It-TCmin taqbeż it-80 % tar-rispons massimu tal-istandard referenzjarju (REF80 = inibizzjoni ta' 20 %).

2 Anqas minn żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi tas-sustanza kimika tat-test ikunu ekwivalenti għall-REF80 jew anqas minnha.

60. Biex tiġi karatterizzata l-potenza tar-rispons pożittiv ta' sustanza kimika tat-test, il-kobor tal-effett (agoniżmu: TC_{max}; antagoniżmu: TC_{min}) u l-konċentrazzjoni li fiha jseħħ l-effett (agoniżmu: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagoniżmu: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}) għandhom jiġu rapportati.

RAPPORT TAT-TEST

61. Ara l-paragrafu 20 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TA TAL-ER"

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, u van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J u Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V u Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B u Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, u van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M u Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, u Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

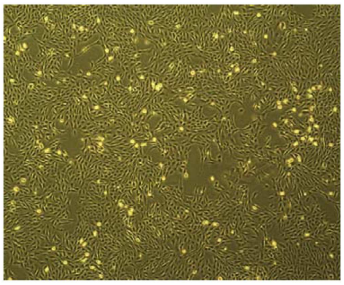
(11) Besselink H, Middelhof I, u Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, in-Netherlands.

Appendiċi 4.1

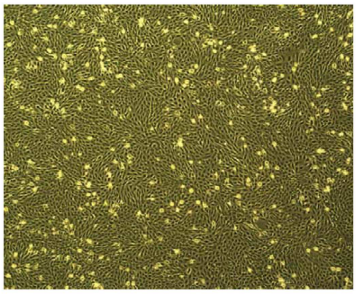
SPEZZJONI VIŻWALI TAL-VIJABBILTÀ TAĊ-ĊELLOLI



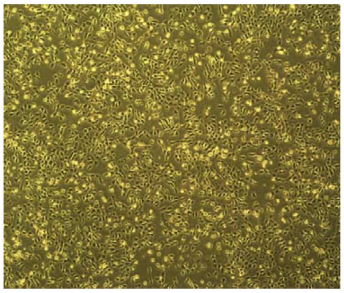
konfluwenza <5 %. Iċ-ċelloli għadhom kif jinżergħu. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 100 %. Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossiċità"



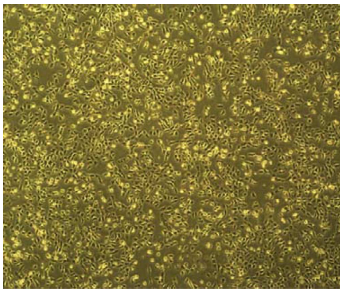
konfluwenza > 85 %. F'dan l-istadju, iċ-ċelloli jkunu esposti għas-sustanzi kimiċi tat-test. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' > 95 %.
Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossiċità"



konfluwenza > 95 %. Iċ-ċelloli jkunu ppakkjati densament u jibdew jikbru b'mod eċċessiv. Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' > 95 %.
Klassifikazzjoni: "ebda ċitotossiċità"



Vijabbiltà taċ-ċelloli ta' < 25 %. Iċ-ċelloli jinqalgħu minn ma' xulxin u l-kuntatt bejniethom jonqos. Iċ-ċelloli jittondjaw. Klassifikazzjoni: "ċitotossiċità"



vijabbiltà taċ-ċelloli ta' < 5 %. Iċ-ċelloli jinqalgħu minn ma' xulxin għalkollox u l-kuntatt bejniethom jispiċċa. Iċ-ċelloli jittondjaw. Klassifikazzjoni: "ċitotossiċità"

B.67 TESTIJIET *IN VITRO* TAL-MUTAZZJONI ĠENETIKA FUQ ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI BL-UŻU TAL-ĠENE TIMIDINA KINAŻI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linji gwida tat-test 490 tal-OECD (2016). Il-metodi ta' ttestjar jiġu rieżaminati u riveduti kull ċertu żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, tal-ħtiġijiet regolatorji u tat-trattament xieraq tal-annimali. L-assaġġ tal-linfoma tal-ġrieden (MLA) u t-test TK6 bl-użu tal-lokus tat-timidina kinaži (TK) oriġinarjament kienu jinsabu fil-metodu ta' ttestjar B.17. Imbagħad, il-Grupp ta' Ħidma ta' Esperti tal-MLA tal-Grupp ta' Ħidma Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossiċità (IWGT) żviluppa rakkomandazzjonijiet armonizzati fil-livell internazzjonali għall-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-assaġġi u għall-interpretazzjoni tad-*data* għall-MLA (1)(2)(3)(4)(5), u dawn ir-rakkomandazzjonijiet huma inkorporati f'dan il-metodu ta' ttestjar il-ġdid B.67. Dan il-metodu ta' ttestjar hu miktub għall-MLA u, minħabba li juża wkoll il-lokus tat-TK, it-test TK6. Filwaqt li l-MLA ntuża ħafna għal finijiet regolatorji, it-TK6 intuża ferm anqas spiss. Ta' min jinnota li minkejja s-similarità bejn il-punti ta' tmiem, iż-żewġ linji ta' ċelloli mhumiex interkambjabbli u l-programmi regolatorji jistgħu jesprimu validament preferenza għal waħda fuq l-oħra għal użu regolatorju partikolari. Pereżempju, il-validazzjoni tal-MLA wriet ix-xerqien ta' dan għad-detezzjoni mhux biss tal-mutazzjoni ġenika, iżda anki l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tinduċi ħsara kromożomika strutturali. Dan il-metodu ta' ttestjar hu parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. L-OECD żviluppat dokument li jipprovdi informazzjoni sintetika fuq l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u ħarsa ġenerali lejn it-tibdiliet riċenti li seħħew fil-linji gwida tat-test tal-OECD dwar it-tossiċità ġenetika (6).

2. L-iskop tat-testijiet *in vitro* tal-mutazzjoni ġenetika fuq ċelloli tal-mammiferi hu li jindividwaw il-mutazzjonijiet ġenetiċi indotti mis-sustanzi kimiċi. Il-linji ta' ċelloli użati f'dawn it-testijiet ikejlu l-mutazzjonijiet 'il quddiem fil-ġeni indikaturi, speċifikament il-ġene timidina kinaži endoġena (*TK* għaċ-ċelloli tal-bniedem u *Tk* għaċ-ċelloli tar-rodituri, kollettivament imsejħa *TK* f'dan il-metodu ta' ttestjar). Dan il-metodu ta' ttestjar hu maħsub biex jintuża b'żewġ linji ta' ċelloli: il-linja ta' ċelloli tal-linfoma tal-ġrieden L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C (ġeneralment imsejħa L5178Y) u l-linja ta' ċelloli linfoblastojde umana TK6 (ġeneralment imsejħa TK6). Għalkemm iż-żewġ linji ta' ċelloli jvarjaw minħabba l-oriġini tagħhom, it-tkabbir taċ-ċelloli, l-istatus tal-p53, eċċ., it-testijiet tal-mutazzjoni ġenika *TK* jistgħu jitwettqu b'mod simili fiż-żewġ tipi ta' ċelloli kif deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar.

3. In-natura awtosomali u eterożiguża tal-ġene timidina kinaži tippermetti d-detezzjoni ta' kolonji vijabbli li ċ-ċelloli tagħhom ikunu nieqsa mill-enzima timidina kinaži wara l-mutazzjoni minn $TK^{+/-}$ għal $TK^{-/-}$. Dan in-nuqqas jista' jirriżulta minn avvenimenti ġenetiċi li jaffettwaw il-ġene *TK* inklużi ż-żewġ mutazzjonijiet ġeniċi (mutazzjonijiet puntwali, mutazzjonijiet li jibdlu l-qari tal-kodiċi ġenetiku, tħassiriet żgħar, eċċ.) u avvenimenti kromożomiċi (tħassiriet kbar, riarranġamenti kromożomali u rikombinazzjoni mitotika). Dawn l-avvenimenti msemmija l-aħħar huma espressi bħala telf tal-eterożigożità, li hu tibdil ġenetiku komuni tal-ġeni suppressur tat-tumuri fit-tumoriġenesi umana. Fit-teorija, telf tal-kromożoma sħiħa li ġġorr il-ġene *TK* li tirriżulta mill-indeboliment tal-fus u/jew minn nondisġunzjoni mitotika jista' jiġi individwat fl-MLA. Tabilħaqq, taħlita ta' analiżi ċitoġenika u molekolari turi biċ-ċar li ċerti mutanti tat-TK tal-MLA huma r-riżultat tan-nondisġunzjoni. Madankollu, il-piż tal-evidenza juri li t-testijiet tal-mutazzjoni ġenika *TK* ma jistgħux jindividwaw b'mod affidabbli anewġeni meta jiġu applikati kriterji standard taċ-ċitotossiċità (kif deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar) u għaldaqstant, mhuwiex xieraq li jintużaw dawn it-testijiet biex jiġu individwati anewġeni (7)(8)(9).

4. Fit-testijiet tal-mutazzjoni ġenika tat-*TK*, jiġu ġenerati żewġ klassijiet fenotipiċi distinti ta' mutanti tat-*TK*; il-mutanti li jikbru normali li jikbru bl-istess rata bħaċ-ċelloli eterożiguži tat-TK, u l-mutanti li jikbru bil-mod li jikbru b'ħinijiet ta' rdoppjar imtawla. Il-mutanti li jikbru normali u dawk li jikbru bil-mod huma rikonoxxuti bħala mutanti ta' kolonja kbira u ta' kolonja żgħira fl-MLA u bħala kolonja li tidher kmieni u bħala mutanti ta' kolonja li tidher tard fit-TK6. In-natura molekolari u ċitoġenetika ta' mutanti tal-MLA ta' kolonji kbar kif ukoll żgħar ġiet esplorata fid-dettall (8)(10)(11)(12)(13). In-natura molekolari u ċitoġenetika tal-mutanti li jidhru kmieni u dawk li jidhru tard tat-TK6 ġiet investigata fil-fond ukoll (14)(15)(16)(17). Mutanti li jikbru bil-mod għaż-żewġ tipi ta' ċelloli ġarrbu ħsara ġenetika li tinvolvi ġene/i regolatorju/i tat-tkabbir putattiv qrib il-locus tat-*TK* li tirriżulta f'ħinijiet ta' rdoppjar imtawla u fil-formazzjoni ta' kolonji li jidhru tard jew żgħar (18). L-induzzjoni ta' mutanti li jikbru bil-mod ġiet assoċjata ma' sustanzi kimiċi li jinduċu tibdiliet strutturali kbar fil-livell kromożomiku. Ċelloli li l-ħsara tagħhom ma tinvolvix il-ġene/i regolatorju/i tat-tkabbir putattiv ħdejn il-lokus tat-TK jikbru b'rati simili għaċ-ċelloli omm u jsiru mutanti li jikbru normali. L-induzzjoni ta' primarjament mutanti li jikbru b'mod normali hi assoċjata ma' sustanzi kimiċi li primarjament jaġixxu bħala mutaġeni puntwali. Konsegwentement, hu essenzjali li jingħaddu kemm il-mutanti li jikbru bil-mod kif ukoll dawk li jikbru normali biex jiġu rkuprati l-mutanti kollha u tiġi pprovduta xi idea dwar it-tip(i) ta' ħsara (mutaġeni vs. klastoġeni) indotta mis-sustanza kimika tat-test (10)(12)(18)(19).

5. Il-metodu ta' ttestjar hu organizzat biex jipprovdi informazzjoni ġenerali li tapplika kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6 u gwida speċjalizzata għat-testijiet individwali.

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Ġeneralment it-testijiet imwettqa *in vitro* jeħtieġu l-użu ta' sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika. Is-sistema esoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*.

8. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati kundizzjonijiet li jistgħu jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali, (jiġifieri interazzjonijiet possibbli mas-sistema tat-test), mhux ikkawżati minn interazzjoni bejn is-sustanza kimika tat-test u l-materjal ġenetiku taċ-ċellola; tali kundizzjonijiet jinkludu tibdiliet fil-pH jew fl-ożmolalità, interazzjoni mal-komponenti tal-medium (20)(21) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossiċità (22)(23)(24). Ċitotossiċità li taqbeż il-livelli massimi rakkomandati ta' ċitotossiċità kif definiti fil-paragrafu 28 titqies eċċessiva għall-MLA u għat-TK6. Barra minn hekk, ta' min jinnota li s-sustanzi kimiċi tat-test li jkunu analogi tat-timidina, jew li jġibu ruħhom bħal analogi tat-timidina jistgħu jżidu l-frekwenza mutanti bit-tkabbir selettiv tal-mutanti ta' sfond spontanji matul it-trattament taċ-ċelloli u jeħtieġu metodi ta' ttestjar addizzjonali għal evalwazzjoni adegwata (25).

9. Għal nanomaterjali manifatturati, jaf ikun hemm bżonn li jsiru adattamenti speċifiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar li ma jkunux deskritti fih.

10. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar ta' taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

11. Iċ-ċelloli mutanti nieqsa mill-attività enzimatika tat-timidina kinaži minħabba mutazzjoni $TK^{+/-}$ għal $TK^{-/-}$ huma reżistenti għall-effetti ċitostatiċi tat-trifluworotimidina (TFT) tal-analogu tal-pirimidina. Iċ-ċelloli profiċjenti huma sensittivi għat-TFT, li toħloq l-inibizzjoni tal-metaboliżmu ċellolari u twaqqaf aktar diviżjoni fiċ-ċelloli. B'hekk, iċ-ċelloli mutanti jkunu kapaċi jipproliferaw fil-preżenza tat-TFT u jifformaw kolonji viżibbli, filwaqt li ċ-ċelloli li fihom l-enzima TK ma jkunux.

PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Iċ-ċelloli f'sospensjoni jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test, kemm b'sors esoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr (ara l-paragrafu 19), għal perjodu xieraq ta' żmien (ara l-paragrafu 33), u mbagħad jiġu subkolturati biex tiġi determinata ċ-ċitotossiċità u titħalla l-espressjoni fenotipika qabel l-għażla tal-mutant. Iċ-ċitotossiċità tiġi determinata bit-tkabbir totali relattiv (RTG—ara l-paragrafu 25) għall-MLA u mis-sopravivenza relattiva (Rs—ara l-paragrafu 26) għat-TK6. Il-kolturi ttrattati jinżammu f'medium tat-tkabbir għal perjodu ta' żmien suffiċjenti, karatteristika ta' kull tip ta' ċellola (ara l-paragrafu 37), biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutazzjonijiet magħmula. Wara l-espressjoni fenotipika, il-frekwenza mutanti tiġi stabbilita biż-żriegħ ta' għadd magħruf ta' ċelloli f'medium li jkun fih l-aġent selettiv biex jiġu żvelati l-kolonji mutanti, u f'medium mingħajr aġent selettiv biex tiġi żvelata l-effiċjenza tal-klonazzjoni (vijabbiltà). Wara perjodu xieraq ta' inkubazzjoni, jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata fuq il-bażi tan-numru ta' kolonji mutanti kkoreġut bl-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Ċelloli

13. Għall-MLA: Minħabba li l-MLA ġie żviluppat u karatterizzatb l-użu tas-sublinja $TK^{+/-}$ −3.7.2C taċ-ċelloli L5178Y, din is-sublinja speċifika trid tintuża għall-MLA. Il-linja ta' ċelloli L5178Y ġiet derivata minn linfoma timika indotta mill-metilkolantren minn ġurdien DBA-2 (26). Clive u l-kollegi ttrattaw ċelloli L5178Y (imsejħa minn Clive bħala $TK^{+/+}$ −3) bis-sulfonat tal-etilmetan u iżolaw klonu tat-$TK^{-/-}$ (imsejjaħ $TK^{-/-}$ −3.7) billi użaw il-bromodeossiuridina bħala l-aġent selettiv. Mill-klonu tat-$TK^{-/-}$, klonu spontanju $TK^{+/-}$ (imsejjaħ $TK^{+/-}$ −3.7.2.) u subklonu (imsejjaħ $TK^{+/-}$−3.7.2C) ġew iżolati u karatterizzati għall-użu fl-MLA (27). Il-karjotip għal-linja ta' ċelloli ġie ppubblikat (28)(29)(30)(31). In-numru tal-kromożoma modali hu 40. Hemm kromożoma metaċentrika waħda (t12;13) li

għandha tingħadd bħala kromożoma waħda. Il-lokus tat-*TK* tal-ġurdien jinsab fit-tarf distali tal-kromożoma 11. Il-linja ta' ċelloli L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C għandha mutazzjonijiet fiż-żewġ alleli p53 u tipproduċi proteina p-53 mutanti (32) (33). L-istatus p53 tal-linja ta' ċelloli $TK^{+/-}$−3.7.2C aktarx li hu responsabbli għall-ħila tat-test li jindividwa ħsara fuq skala kbira (17).

14. Għat-TK6: It-TK6 hi linja ta' ċelloli linfoblastojde umana. Il-linja ta' ċelloli omm hi linja ta' ċelloli trasformata b'vajrus Epstein-Barr, WI-L2, li oriġinarjament inkisbet minn tifel ta' ħames snin bi sferoċitożi ereditarja. L-ewwel klonu iżolat, HH4, ġie mutaġenizzat b'ICR191 u ġiet ġenerata linja ta' ċelloli eterożiguża tat-*TK* (34). Iċ-ċelloli TK6 huma kważi diplojdi u l-karjotip rappreżentattiv hu 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Il-lokus tat-*TK* uman jinsab fil-fergħa twila tal-kromożoma 17. It-TK6 hi linja ta' ċelloli kompetenti tal-p53, minħabba li għandha sekwenza p53 tat-tip selvaġġ fiż-żewġ alleli u tesprimi biss il-proteina p53 tat-tip selvaġġ (36).

15. Kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6, meta l-ewwel jiġi stabbilit jew rifornit stokk prinċipali, hu rakkomandat li l-laboratorju tal-ittestjar jiżgura n-nuqqas ta' kontaminazzjoni bil-*Mikoplażma*, jagħti karjotip liċ-ċelloli jew jiżbogħ il-kromożomi li jħaddnu l-lokus tat-*TK*, u jivverifikaw il-ħinijiet ta' rdoppjar tal-popolazzjoni. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli għaċ-ċelloli użati fil-laboratorju tal-ittestjar għandu jkun stabbilit u konsistenti mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati (16)(19)(37). Dan l-istokk prinċipali għandu jinħażen f'-150° C jew anqas u jintuża biex jitħejjew l-istokkijiet taċ-ċelloli operatorji kollha.

16. Jew qabel ma jiġi stabbilit numru kbir ta' stokkijiet operatorji krijopreservati jew inkella eżatt qabel l-użu f'esperiment, il-koltura jaf ikollha titnaddaf miċ-ċelloli mutanti preeżistenti [sakemm il-frekwenza tal-mutanti tal-kontroll b'solvent (MF) ma tkunx diġà fi ħdan il-medda aċċettabbli—ara t-Tabella 2 għall-MLA)]. Dan jinkiseb bl-użu tal-metotreksat (*amminopterina*) biex jintgħażlu kontra ċelloli nieqsa mit-TK u jiżdiedu t-timidina, l-ipossantina u l-gliċina (L5178Y) jew 2'-deossiċitidina (TK6) mal-koltura biex jiġi żgurat tkabbir ottimali taċ-ċelloli kompetenti tat-TK (19)(38)(39), u (40) għat-TK6). Parir ġenerali dwar il-prattika tajba għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli kif ukoll parir speċifiku għaċ-ċelloli L5178Y u TK6 jistgħu jinkisbu minn (19)(31)(37)(39)(41). Għal laboratorji li jeħtieġu stokkijiet ta' ċelloli prinċipali biex jibdew l-MLA jew inkella t-TK6 jew biex jiksbu stokkijiet ta' ċelloli prinċipali ġodda, hemm disponibbli repożitorju taċ-ċelloli ta' ċelloli karatterizzati sew (37).

Kundizzjonijiet tal-media tal-koltura

17. Għaż-żewġ testijiet, għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tal-koltura u tal-inkubazzjoni (eż. reċipjenti tal-koltura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO2, temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37 °C) għaż-żamma tal-kolturi. Il-kolturi taċ-ċelloli dejjem għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet li jiżguraw li jkunu qed jikbru fil-fażi log. Hu partikolarment importanti li jintgħażlu kundizzjonijiet tal-media u tal-kolturi li jiżguraw l-iżvilupp ottimali taċ-ċelloli matul il-perjodu ta' espressjoni u klonazzjoni kemm għaċ-ċelloli mutanti kif ukoll għal dawk mhux mutanti. Għall-MLA u għat-TK6, hu importanti wkoll li l-kundizzjonijiet tal-koltura jiżguraw it-tkabbir ottimali kemm tal-mutanti tat-TK ta' kolonji kbar/li jidhru kmieni kif ukoll ta' kolonji żgħar/li jidhru tard. Aktar dettalji dwar il-koltura, inkluża l-ħtieġa li jissaħħan kif suppost is-serum taż-żwiemel inattivat jekk jintuża l-medium tal-RPMI matul l-għażla tal-mutanti, jistgħu jinkisbu minn (19)(31)(38)(39)(40)(42).

Preparazzjoni tal-kolturi

18. Iċ-ċelloli jiġu propagati minn kolturi omm, miżrugħa fil-medium tat-tkabbir b'densità tali li l-kolturi f'sospensjonijiet jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali matul it-trattament u l-perjodi ta' espressjoni kollha kemm huma.

Attivazzjoni metabolika

19. Għandhom jintużaw sistemi metabolizzanti esoġeni meta jintużaw ċelloli L5178Y u TK6 għaliex għandhom kapaċità metabolika endoġena inadegwata. L-aktar sistema użata spiss, li hi l-ewwel rakkomandata, sakemm ma jkunx ġustifikat mod ieħor, hi frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imħejjija mill-fwied ta' rodituri (ġeneralment firien) trattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (43)(44)(45) jew taħlita ta' fenobarbital u ta' β-naftoflavon (46)(47)(48)(49)(50)(51). Din it-taħlita msemmija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni

ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes (52) u ntwera li hi effettiva daqs Aroclor1254 għall-induzzjoni ta' ossidażijiet b'funzjoni mħallta (45)(46)(47)(48)(49). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1-2 % (v/v) iżda tista' tiżdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-għażla tat-tip u l-konċentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena jew induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi kimiċi tat-test.

Preparati tas-sustanza kimika tat-test

20. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 21). Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokolli standard, bħat-trattament f'reċipjenti tal-koltura ssiġillati (53)(54)(55). Il-preparati tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-*data* dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħżin.

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST

Solventi

21. Is-solvent għandu jingħażel biex tiġi ottimizzata s-solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test mingħajr ma jitħalla impatt avvers fuq it-twettiq tal-assaġġ, eż. tibdil fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-koltura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Hu rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tat-tkabbir). Fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma jew is-sulfossidu tad-dimetil. Ġeneralment, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbżu l-1 % (v/v) u s-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbżu l-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk jintużaw solventi li ma jkunux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn *data* li tindika l-kompatibbiltà tagħhom mas-sustanzi kimiċi tat-test, mas-sistema tat-test, u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika bil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-*data* ta' sostenn, importanti li jiġu inklużi kontrolli mhux trattati (ara l-Appendiċi 1, Definizzjonijiet) biex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduċi ebda effett dannuż jew mutaġeniku.

KEJL TAĊ-ĊITOTOSSIĊITÀ U GĦAŻLA TAL-KONĊENTRAZZJONIJIET TAT-TRATTAMENT

22. Meta wieħed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva (ara l-paragrafu 28), il-preċipitazzjoni (ara l-paragrafu 29) fil-medium tat-tkabbir, jew bidliet ċari fil-pH jew ożmolalità (ara l-paragrafu 5). Jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaġuna tibdil ċar fil-pH tal-medium fi żmien iż-żieda, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali biex jiġu evitati riżultati pożittivi artefattwali u biex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-koltura.

23. L-għażla tal-konċentrazzjoni hi bbażata fuq iċ-ċitotossiċità u fuq kunsiderazzjonijiet oħra (ara l-paragrafi 27-30). Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità f'test inizjali tista' tkun siewja biex jiġu definiti aħjar il-konċentrazzjonijiet li jkunu se jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex meħtieġ. Anki jekk issir evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità inizjali, il-kejl taċ-ċitotossiċità għal kull koltura xorta waħda jkun meħtieġ fl-esperiment ewlieni. Jekk isir esperiment għas-sejbien tal-medda, dan għandu jkopri firxa wiesgħa ta' konċentrazzjonijiet u jista' jew jiġi terminat fil-jum 1 wara t-trattament jew jibqa' għaddej matul l-espressjoni tal-jum 2 u l-għażla tal-mutanti (jekk jidher li l-konċentrazzjonijiet użati jkunu xierqa).

24. Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi determinata għal kull koltura tat-test u kull koltura tal-kontroll individwali: il-metodi għall-MLA (2) u għat-TK6 (15) huma definiti bi prattika miftiehma fil-livell internazzjonali.

25. Kemm għall-verżjoni tal-agar kif ukoll għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA: Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi evalwata bl-użu tat-tkabbir totali relattiv (RTG) li orġinarjament ġie definit minn Clive u Spector fl-1975 (2). Dan il-kejl jinkludi l-iżvilupp relattiv f'sospensjoni (RSG: koltura tat-test vs. kontroll b'solvent) matul it-trattament taċ-ċelloli, il-ħin tal-espressjoni u l-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva (RCE): koltura tat-test vs. kontroll b'solvent) fil-ħin li fih jingħażlu l-mutanti (2). Ta' min jinnota li l-RSG jinkludi kwalunkwe telf ta' ċelloli li jseħħ fil-koltura tat-test matul it-trattament (Ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).

26. Għal TK6: Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi evalwata bl-użu tas-sopravivenza relattiva (RS), jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament, aġġustata għal kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament, fuq il-bażi tal-għadd taċ-ċelloli, meta mqabbla mal-l-kontroll negattiv (assenjati sopravivenza ta' 100 %) (Ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

27. Għandhom jiġu evalwati tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inklużi l-kontrolli tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabbiltà (iċ-ċitotossiċità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Filwaqt li l-użu ta' kolturi duplikati hu rakkomandat, jistgħu jintużaw kolturi repliki jew trattati individwalment f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Ir-riżultati miksuba għall-kolturi rreplikati f'konċentrazzjoni partikolari għandhom jiġu rrapportati b'mod separat iżda jistgħu jiġu aggregati għall-analiżi tad-*data* (55). Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru tossiċità baxxa jew ebda tossiċità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-triplu normalment ikunu xierqa. Meta sseħħ ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet għandhom jintgħażlu biex ikopru l-medda ta' ċitotossiċità minn dik iċ-ċitotossiċità produttiva kif deskritta fil-paragrafu 28 u inklużi konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossiċità moderata u baxxa jew ebda ċitotossiċità. Ħafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons wiqfin u, biex tkun koperta l-medda sħiħa taċ-ċitotossiċità jew biex jiġu studjati l-konċentrazzjoni u r-rispons fid-dettall, jaf ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjonijiet spazjati aktar qrib xulxin u aktar minn erba' konċentrazzjonijiet, speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 43). L-użu ta' aktar minn erba' konċentrazzjonijiet jista' jkun partikolarment importanti meta jintużaw kolturi individwali.

28. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilħaq bejn 20 u 10 % RTG għall-MLA, u bejn 20 u 10 % RS għat-TK6 (paragrafu 67).

29. Għal sustanzi kimiċi tat-test ftit li xejn solubbli li mhumiex ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet anqas mill-anqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajnuna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossiċità sseħħ f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni waħda biss li tipproduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artifattwali mill-preċipitat. Peress li l-MLA u t-TK6 jużaw kolturi ta' sospensjoni, għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekkilx it-twettiq tat-test. Id-determinazzjoni tas-solubbiltà fil-medium tat-tkabbir qabel l-esperiment tista' tkun utli wkoll.

30. Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossiċità li tillimita, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-anqas (57)(58). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa [jiġifieri Sustanzi Kimiċi b'Kompożizzjoni mhux magħrufa jew Varjabbli (UVCBs)], estratti ambjentali, eċċ., il-konċentrazzjoni massima jaf ikollha bżonn tkun ogħla (eż. 5 mg/ml), fin-nuqqas ta' biżżejjed ċitotossiċità, biex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wieħed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (59).

Kontrolli

31. Għal kull kundizzjoni sperimentali għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 21) li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u mmaniġġjati bl-istess mod bħall-kolturi tat-trattament.

32. Kontrolli pożittivi konkorrenti huma meħtieġa biex juru l-ħila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' mutaġeni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat, l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġena (meta applikabbli), u biex tintwera detezzjoni adegwata ta' mutanti tat-*TK* żgħar/li jidhru tard kif ukoll dawk kbar/li jidhru kmieni. Fit-tabella 1 ta' hawn taħt jingħataw eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll pożittiv oħra, jekk ikunu ġustifikati. Peress li t-testijiet *in vitro* taċ-ċelloli tal-mammiferi huma standardizzati biżżejjed għal trattamenti fuq terminu qasir (minn tlieta sa erba' sigħat) li jsiru b'mod parallel ma' u mingħajr attivazzjoni metabolika bl-użu tal-istess durata tat-trattament, l-użu tal-kontrolli pożittivi jista' jkun limitat għal mutaġenu li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. F'dan il-każ, dan ir-rispons tal-kontroll pożittiv individwali se juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll ir-responsività tas-sistema tat-test. Madankollu, jekk jintuża, trattament fit-tul (jiġifieri 24 siegħa mingħajr S9) għandu jkollu l-kontroll pożittiv tiegħu stess peress li d-durata tat-trattament sejra tvarja mit-test bl-użu tal-attivazzjoni metabolika. Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'konċentrazzjoni waħda jew aktar li tkun mistennija tagħti żidiet riproduċibbli u individwabbli li jispikkaw biex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test, u r-rispons ma għandux ikun imxekkel miċ-ċitotossiċità li taqbeż il-limiti speċifikati f'dan it-TM (ara l-paragrafu 28).

Tabella 1

Sustanzi ta' referenza rakkomandati għall-valutazzjoni tal-proficjenza tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi

Kategorija	Sustanza	CASRN
1. Mutaġeni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika		
	Metansulfonat tal-metil	66-27-3
	Mitomiċina C	50-07-7
	4-Nitrokinolina-N-Ossidu	56-57-5
2. Mutaġeni li jeħtieġu attivazzjoni metabolika		
	Benżo(a)piren	50-32-8
	Ċiklofosfammid (monoidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetilbenżantraċen	57-97-6
	3-Metilkolantren	56-49-5

PROĊEDURA

Trattament bis-sustanza kimika tat-test

33. Ċelloli li jipproliferaw huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika. L-esponiment għandu jkun għal perjodu xieraq ta' żmien (normalment perjodu ta' bejn tlieta u erba' sigħat ikun adegwat). Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (59). Għall-MLA, f'każijiet li fihom it-trattament fuq terminu qasir irendi riżultati negattivi, u jkun hemm informazzjoni li tissuġġerixxi l-ħtieġa ta' trattament itwal [eż. analogi nukleosidiċi, sustanzi kimiċi ftit li xejn solubbli, (5)(59)], għandha tingħata kunsiderazzjoni għat-twettiq tat-test mingħajr trattament aktar fit-tul, jiġifieri 24 siegħa mingħajr S9.

34. In-numru minimu ta' ċelloli użati għal kull koltura tat-test (tal-kontroll u trattata) f'kull stadju fit-test għandu jkun ibbażat fuq il-frekwenza mutanti spontanja. Gwida ġenerali hi li jiġu trattati u passaġġati biżżejjed ċelloli f'kull koltura tal-esperiment biex jinżammu, tal-anqas, 10 iżda, idealment, 100 mutant spontanju f'kull fażi tat-test (trattament, espressjoni fenotipika u għażla tal-mutanti) (56).

35. Għall-MLA, il-frekwenza mutanti spontanja aċċettabbli rakkomandata hi ta' bejn 35-140 × 10^{-6} (il-verżjoni tal-agar) u 50-170 × 10^{-6} (il-verżjoni tal-mikropjastri) (ara t-Tabella 2). Biex tal-anqas ikun hemm 10 u, idealment, 100 mutant spontanju li jibqgħu ħajjin wara t-trattament għal kull koltura tat-test, hemm bżonn li tal-anqas jiġu trattati 6 × 10^{6} ċelloli. L-immirar għal dan in-numru ta' ċelloli, u ż-żamma ta' biżżejjed ċelloli matul l-espressjoni u l-klonazzjoni għall-għażla tal-mutanti, jipprovdu għal numru suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) matul kull fażi tal-esperiment, anki għall-kolturi trattati f'konċentrazzjonijiet li jirriżultaw f'ċitotossiċità ta' 90 % (kif imkejla minn RTG ta' 10 %) (19)(38)(39).

36. Għat-TK6, il-frekwenza mutanti spontanja ġeneralment tkun ta' bejn 2 u 10 × 10-6. Biex tal-anqas ikun hemm 10 mutanti spontanji li jibqgħu ħajjin wara t-trattament għal kull koltura, hemm bżonn li tal-anqas jiġu trattati 20 × 10^{6} ċelloli. It-trattament ta' dan in-numru ta' ċelloli jipprovdi għal numru suffiċjenti ta' mutanti spontanji (10 jew aktar) anki għall-kolturi trattati f'konċentrazzjonijiet li jikkawżaw ċitotossiċità ta' 90 % matul it-trattament (10 % RS). Barra minn hekk, numru suffiċjenti ta' ċelloli jridu jiġu kolturati matul il-perjodu ta' espressjoni u pjastrati għall-għażla tal-mutanti (60).

Il-ħin tal-espressjoni fenotipika u l-kejl taċ-ċitotossiċità u tal-frekwenza tal-mutanti

37. Fi tmiem il-perjodu tat-trattament, iċ-ċelloli jiġu kolturati għal ħin definit biex tinkiseb espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutanti indotti ġodda; speċifiku għal kull linja ta' ċelloli. Għall-MLA, il-perjodu tal-espressjoni fenotipika hu ta' jumejn (2). Għat-TK6, il-perjodu tal-espressjoni fenotipika hu ta' bejn tlieta u erbat ijiem. Jekk jintuża trattament ta' 24 siegħa, il-perjodu ta' espressjoni jibda wara li jintemm it-trattament.

38. Matul il-perjodu tal-espressjoni fenotipika, iċ-ċelloli jiġu enumerati fuq bażi ta' kuljum. Għall-MLA, l-għadd ta' kuljum taċ-ċelloli jintuża biex jiġi kkalkolati t-tkabbir ta' kuljum tas-sospensjoni (SG). Wara l-perjodu ta' espressjoni ta' jumejn (2), iċ-ċelloli jiġu sospiżi f'medium b'aġent selettiv u mingħajr għad-determinazzjoni tan-numri ta' mutanti (pjastri tal-għażla) u għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (pjastri tal-vijabbiltà), rispettivament. Għall-MLA hemm żewġ metodi aċċettabbli ndaqs għall-klonazzjoni tal-għażla tal-mutanti; wieħed juża l-agar artab u l-ieħor juża medium likwidu fi pjastri b'96 bwejra (19) (38) (39). Il-klonazzjoni fit-TK6 issir bl-użu ta' media likwida u bi pjastra b'96 bwejra (16).

39. It-trifluworotimidina (TFT) hi l-uniku aġent selettiv rakkomandat għall-mutanti tat-*TK* (61).

40. Għall-MLA, il-pjastri tal-agar u l-mikropjastri jingħaddu wara inkubazzjoni ta' 10-12-il jum. Għat-TK6, il-kolonji f'mikropjastri jingħataw punteġġ wara 10-14-il jum għall-mutanti li jidhru kmieni. Biex jiġu rkuprati l-mutanti tat-TK6 li jikbru bil-mod (li jidhru tard), hemm bżonn li ċ-ċelloli jiġu magħlufa mill-ġdid b'medium tat-tkabbir u b'TFT wara l-għadd tal-mutanti li jidhru kmieni u mbagħad il-pjastri jridu jiġu inkubati għal 7-10 ijiem addizzjonali (62). Ara l-paragrafi 42 u 44 għal diskussjoni dwar l-enumerazzjoni tal-mutanti tat-*TK* li jikbru bil-mod u normali.

41. Il-kalkoli xierqa għaż-żewġ testijiet inklużi ż-żewġ metodi (agar u mikropjastri) għall-MLA jinsabu fl-Appendiċi 2. Għall-metodu tal-agar tal-MLA, il-kolonji jingħaddu u n-numru ta' kolonji ta' mutanti jiġu aġġustati skont l-effiċjenza tal-klonazzjoni biex tiġi kkalkolata MF. Għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA u tat-TK6, l-effiċjenza tal-klonazzjoni kemm għall-għażla kif ukoll għall-pjastri tal-effiċjenza tal-klonazzjoni tiġi determinata skont id-distribuzzjoni ta' Poisson (63). L-MF tiġi kkalkolata minn dawn iż-żewġ effiċjenzi tal-klonazzjoni.

Karatterizzazzjoni tal-Kolonji tal-Mutanti

42. Għall-MLA, jekk is-sustanza kimika tat-test tkun pożittiva (ara l-paragrafi 62-63), il-karatterizzazzjoni tal-kolonja skont id-daqs tal-kolonja jew it-tkabbir għandha ssir fuq tal-anqas waħda mill-kolturi tat-test (ġeneralment l-oġħla konċentrazzjoni pożittiva aċċettabbli) u fuq il-kontrolli negattivi u pożittivi. Jekk is-sustanza kimika tat-test tkun negattiva (ara l-paragrafu 64), il-karatterizzazzjoni tal-kolonji mutanti għandha ssir fuq il-kontrolli negattivi u pożittivi. Għall-metodu tal-mikropjastri tal-MLA, il-mutanti tal-kolonji żgħar huma definiti bħala dawk li jkopru anqas minn 25 % tad-dijametru tal-bwejra u mutanti tal-kolonji kbar huma dawk li jkopru aktar minn 25 % tad-dijametru tal-bwejra. Għall-metodu tal-agar, jintuża mezz awtomatiku li jgħodd il-kolonji biex jiġu enumerati l-kolonji tal-mutanti u jittieħed id-daqs tal-kolonji. L-approċċi għat-teħid tad-daqs tal-kolonji huma spjegati fid-dettall fid-dokumentazzjoni (19)(38)(40). Il-karatterizazzjoni tal-kolonji fuq il-kontroll negattiv u dak pożittiv hi meħtieġa biex jintwera li l-istudji jitwettqu b'mod adegwat.

43. Is-sustanza kimika tat-test ma tistax tiġi determinata bħala negattiva jekk kemm il-mutanti tal-kolonji kbar kif ukoll dawk żgħar ma jkunux individwati b'mod adegwat fil-kontroll pożittiv. Il-karatterizzazzjoni tal-kolonji tista' tintuża biex tiġi pprovduta informazzjoni ġenerali dwar il-ħila tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża mutazzjonijiet puntwali u/jew avvenimenti kromożomiċi (il-paragrafu 4).

44. TK6: Mutanti li jikbru normali u dawk li jikbru bil-mod huma differenzjati minn differenza fil-ħin ta' inkubazzjoni (ara l-paragrafu 40). Għat-TK6, ġeneralment kemm il-mutanti li jidhru kmieni kif ukoll dawk li jidhru tard jingħataw punteġġ għall-kolturi kollha inklużi l-kontrolli negattivi u pożittivi. Il-karatterizazzjoni tal-kolonji tal-kontroll negattiv u ta' dak pożittiv hi meħtieġa biex jintwera li l-istudji jitwettqu b'mod adegwat. Is-sustanza kimika tat-test ma tistax tiġi determinata bħala negattiva jekk kemm il-mutanti li jidhru kmieni kif ukoll dawk li jidhru tard ma jkunux individwati b'mod adegwat fil-kontroll pożittiv. Il-karatterizzazzjoni tal-kolonji tista' tintuża biex tiġi pprovduta informazzjoni ġenerali dwar il-ħila tas-sustanza kimika tat-test li tikkawża mutazzjonijiet puntwali u/jew avvenimenti kromożomiċi (il-paragrafu 4).

Profiċjenza tal-laboratorju

45. Biex tintwera biżżejjed esperjenza bit-test qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi pożittivi ta' referenza li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti (tal-anqas waħda b'attivazzjoni metabolika u waħda mingħajr magħżula mis-sustanzi elenkati fit-Tabella 1) u diversi kontrolli negattivi (inklużi kolturi mhux trattati u diversi solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontroll pożittiv u negattiv reazzjonijiet għandhom ikunu konsistenti mad-dokumentazzjoni. Dan ir-rekwiżit mhuwiex applikabbli għal laboratorji li jkollhom esperjenza, jiġifieri li jkollhom bażi ta' *data* storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 47-50. Għall-MLA, il-valuri miksuba għall-kontrolli pożittivi kif ukoll għal dawk negattivi għandhom ikunu konsistenti mar-rakkomandazzjonijiet tal-IWGT (ara t-Tabella 2).

46. Għażla ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv (ara t-Tabella 1 fil-paragrafu 25) għandha tiġi investigata bi trattamenti qosra u twal (jekk jintużaw trattamenti twal) fin-nuqqas ta' attivazzjoni metabolika, u anki bit-trattament qasir fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, biex tintwera l-profiċjenza fl-iżvelar ta' sustanzi kimiċi mutaġeniċi, biex tiġi ddeterminata l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u biex tintwera l-adegwatezza tal-kundizzjonijiet tat-tkabbir taċ-ċelloli matul it-trattament, l-espressjoni fenotipika u l-għażla tal-mutanti u tal-proċeduri tal-għoti ta' punteġġ. Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi magħżulin biex jingħataw żidiet riproduċibbli u marbutin mal-konċentrazzjoni li jispikkaw biex jintwerew is-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test.

***Data* storika tal-kontroll**

47. Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv,

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv (mhux trattat, solvent).

48. Meta għall-ewwel tinkiseb id-*data* għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu konsistenti mad-*data* tal-kontroll negattiv ippubblikata. Peress li tiżdied aktar *data* sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (64)(65).

49. Il-bażi ta' *data* storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-anqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (65), biex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-*data* tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u biex juru li l-metodoloġija hi "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (66). Aktar dettalji u rakkomandazzjonijiet dwar kif tibni u tuża d-*data* storika jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (64).

50. Id-*data* ta' kontroll negattiv għandha tikkonsisti fi frekwenzi mutanti minn kolturi individwali jew idealment repliki kif deskritt fil-paragrafu 27. Idealment, il-kontrolli negattivi konkorrenti għandhom ikunu fi ħdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni tal-bażi ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju. Meta d-*data* tal-kontroll negattiv toħroġ mil-limitu ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħħal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll dment li din id-*data* ma tkunx eċċezzjoni estrema, ikun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 49) u jkun hemm evidenza ta' ebda żball tekniku jew uman.

51. Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tad-*data* mal-bażijiet ta' *data* tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' bażi ta' *data* storika ġdida tal-kontroll.

DATA U RAPPORTAR

Preżentazzjoni tar-riżultati

52. Il-preżentazzjoni tad-*data* għall-MLA kif ukoll għat-TK6 għandha tinkludi, għall-kolturi trattati kif ukoll għal dawk tal-kontroll, id-*data* meħtieġa għall-kalkolu taċ-ċitotossiċità (RTG jew RS, rispettivament) u tal-frekwenzi mutanti, kif deskritti hawn taħt.

53. Għall-MLA, id-data tal-kolturi individwali għandha tiġi pprovduta għall-RSG, għall-RTG, għall-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti u għan-numru ta' kolonji ta' mutanti (għall-verżjoni tal-agar) jew għan-numru ta' bwejriet vojta (għall-verżjoni tal-mikropjastri). L-MF għandha tiġi espressa bħala numru ta' ċelloli mutanti għal kull miljun ċellola li tibqa' ħajja. Jekk ir-rispons ikun pożittiv, l-MFs ta' kolonji żgħar u kbar (u/jew il-perċentwal tal-MF totali) għandhom jingħataw għal tal-anqas konċentrazzjoni waħda tas-sustanza kimika tat-test (ġeneralment l-ogħla konċentrazzjoni pożittiva) u għall-kontrolli negattivi u pożittivi. Fil-każ ta' rispons negattiv, l-MF tal-kolonji żgħar u kbar għandha tingħata għall-kontroll negattiv u għall-kontroll pożittiv.

54. Għat-TK6, id-*data* dwar il-kolturi individwali għandha tiġi pprovduta għall-RS, għall-effiċjenza tal-klonazzjoni fil-mument tal-għażla tal-mutanti u għan-numru ta' bwejriet vojta għall-mutanti li jidhru kmieni u dawk li jidhru tard. L-MF għandha tiġi espressa bħala numru ta' ċelloli mutanti għal kull numru ta' ċelloli li jibqgħu ħajjin, u għandha tinkludi l-MF totali kif ukoll l-MF (u/jew il-perċentwal tal-MF totali) tal-mutanti li jidhru kmieni u tard.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà

55. Kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6, għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji li ġejjin qabel ma jiġu determinati r-riżultati ġenerali għal sustanza kimika tat-test speċifika:

— Saru żewġ kundizzjonijiet sperimentali (trattament qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajr - ara l-paragrafu 33) sakemm waħda ma rriżultatx f'riżultati pożittivi.

— Għandu jkun analizzabbli numru adegwat ta' ċelloli u ta' dożi (ara l-paragrafi 27, 34-36).

— Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 28-30.

Il-kriterji ta' aċċettabbiltà għall-kontrolli negattivi u pożittivi

56. L-analiżi mill-Grupp ta' Ħidma ta' Esperti tal-MLA tal-IWGT ta' ammont estensiv ta' *data* dwar l-MLA sarrfet f'kunsens internazzjonali għal kriterji ta' aċċettabbiltà speċifiċi għall-MLA (1)(2)(3)(4)(5). Għaldaqstant, dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi rakkomandazzjonijiet speċifiċi għad-determinazzjoni tal-aċċettabbiltà tal-kontrolli negattivi u pożittivi u għall-evalwazzjoni tar-riżultati ta' sustanzi individwali fl-MLA. It-TK6 għandha bażi ta' *data* ferm iżgħar u ma saritilhiex evalwazzjoni minn grupp ta' ħidma.

57. Għall-MLA, kull esperiment għandu jiġi evalwat dwar jekk il-kontroll mhux trattat/b'solvent jissodisfax il-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-Grupp ta' Ħidma dwar l-MLA tal-IWGT ((4) u t-Tabella 2, hawn taħt): (1) għall-MF (kun af li l-MFs aċċettabbli tal-IWGT huma differenti għall-verżjonijiet tal-agar u tal-mikropjastri tal-MLA), (2) għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) fil-ħin tal-għażla tal-mutanti u (3) għall-iżvilupp f'sospensjoni (SG) għall-kontroll b'solvent (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli).

Tabella 2

Il-kriterji ta' aċċettabbiltà għall-MLA

Parametru	Metodu tal-Agar Artab	Metodu tal-Mikropjastri
Frekwenza Mutanti	$35 - 140 \times 10^{-6}$	$50 - 170 \times 10^{-6}$
Effiċjenza tal-Klonazzjoni	65 - 120 %	65 - 120 %
Żvilupp f'Sospensjoni	8 – 32 darba (trattament ta' 3-4 sigħat) 32 – 180 darba (trattament ta' 24 sigħat, jekk isir)	8 – 32 darba (trattament ta' 3-4 sigħat) 32 – 180 darba (trattament ta' 24 sigħat, jekk isir)

58. Għall-MLA, kull test għandu jkun evalwat ukoll dwar jekk il-kontroll(i) pożittiv(i) jissodisfax/jissodisfawx tal-anqas wieħed miż-żewġ kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin żviluppati mill-grupp ta' ħidma tal-IWGT:

— Il-kontroll pożittiv għandu juru żieda assoluta fl-MF totali, jiġifieri żieda ta' aktar mill-MF ta' sfond spontanja [MF indotta (IMF)] ta' tal-anqas 300×10^{-6}. Tal-anqas 40 % tal-IMF għandha tkun riflessa fl-MF tal-kolonja ż-żgħira.

— Il-kontroll pożittiv għandu żieda fl-MF tal-kolonja ż-żgħira ta' tal-anqas 150×10^{-6} ogħla minn dik li dehret fil-kontroll mhux trattat/b'solvent konkorrenti (IMF ta' kolonja żgħira ta' 150×10^{-6}).

59. Għat-TK6, test ikun aċċettabbli jekk il-kontroll negattiv konkorrenti jitqies aċċettabbli għaż-żieda fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafi 48-49. Barra minn hekk, il-kontrolli negattivi konkorrenti (ara l-paragrafu 32) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fil-bażi ta' *data* storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv konkorrenti.

60. Għaż-żewġ testijiet, il-limitu superjuri taċ-ċitotossiċità osservat fil-koltura tal-kontroll pożittiv għandu jkun l-istess bħal dak tal-kolturi sperimentali. Jiġifieri, l-RTG/RS ma għandhiex tkun anqas minn 10 %. Biżżejjed li tintuża konċentrazzjoni waħda (jew waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-kolturi tal-kontroll pożittiv jekk tintuża aktar minn konċentrazzjoni waħda) biex jintwera li ġew issodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni għall-kontroll pożittiv. Barra dan, l-MF tal-kontroll pożittiv trid tkun fi ħdan il-medda aċċettabbli stabbilita għal-laboratorju.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

61. Għall-MLA, il-Grupp ta' Ħidma Espert tal-IWGT dwar il-Linfoma fil-Ġrieden (4) għamel ħidma importanti dwar ir-rilevanza bijoloġika u l-kriterji għal rispons pożittiv. Għaldaqstant, dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi rakkomandazzjonijiet speċifiċi għall-interpretazzjoni tar-riżultati tas-sustanzi kimiċi tat-test mill-MLA (ara l-paragrafi 62-64). It-TK6 għandha bażi ta' *data* ferm iżgħar u ma saritilhiex evalwazzjoni minn grupp ta' ħidma. Għaldaqstant, ir-rakkomandazzjonijiet għall-interpretazzjoni tad-*data* għat-TK6 huma mogħtija f'termini aktar ġenerali (ara l-paragrafi 65-66). Rakkomandazzjonijiet addizzjonali japplikaw għaż-żewġ testijiet (ara l-paragrafi 67-71).

MLA

62. Approċċ għad-definizzjoni tar-risponsi pożittiv u negattivi hu rakkomandat biex jiġi żgurat li l-MF miżjuda hi bijoloġikament rilevanti. Minflok l-analiżi statistika ġeneralment użata għal testijiet oħra, dan jibbaża fuq l-użu ta' frekwenza mutanti indotta predefinita (jiġifieri żieda fl-MF ogħla mill-kontroll konkorrenti), imsejħa l-Fattur ta' Evalwazzjoni Globali (GEF), li hu bbażat fuq l-analiżi tad-distribuzzjoni tad-*data* dwar l-MF tal-kontroll negattiv mil-laboratorji parteċipanti (4). Għall-verżjoni tal-agar tal-MLA, il-GEF hu ta' 90×10^{-6} u għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA, il-GEF hu ta' 126×10^{-6}.

63. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun pożittiva biċ-ċar jekk, f'xi waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati (ara l-paragrafu 33), iż-żieda fl-MF ogħla mill-isfond konkorrenti taqbeż il-GEF u ż-żied tkun relatata mal-konċentrazzjoni (eż. bl-użu ta' test tat-tendenzi). Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li kapaċi tinduċi mutazzjoni f'din is-sistema tat-test.

64. Dment li ma jiġux issodisati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li tkun negattiva ċara jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati kollha (ara l-paragrafu 33), ma jkun hemm ebda rispons relatat mal-konċentrazzjoni jew, jekk ikun hemm żieda fl-MF, din ma taqbiżx il-GEF. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet f'din is-sistema tat-test.

TK6

65. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi pożittiva ċara jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati (ara l-paragrafu 33):

— tal-anqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti

— iż-żieda hi relatata mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi (ara l-paragrafu 33)

— kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 48).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi mutazzjoni f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-aktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mid-dokumentazzjoni (66)(67).

66. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hi negattiva ċara jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali eżaminati kollha (ara l-paragrafu 33):

— l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv konkorrenti,

— ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi

— ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-*data* storika tal-kontroll negattiv (eż. limitu tal-kontroll ta' 95 % fuq il-bażi ta' Poisson; ara l-paragrafu 48).

Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi mutazzjonijiet f'din is-sistema tat-test.

Għall-MLA kif ukoll għat-TK6:

67. Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tilħaq RTG/RS ta' bejn 20 u 10 %. Il-kunsens hu li għandha tingħata attenzjoni meta jiġu interpretati riżultati pożittivi li jinstabu biss f'RTG/RS ta' bejn 20 u 10 % u riżultat ma jitqiesx pożittiv jekk iż-żieda fl-MF tkun seħħet biss f'RTG/RS ta' 10 % jew anqas (jekk evalwati) (2) (59).

68. Hemm xi ċirkustanzi li fihom informazzjoni addizzjonali tista' tassisti fid-determinazzjoni li sustanza kimika tat-test ma tkunx mutaġenika meta ma jkun hemm ebda koltura li turi valur tal-RTG ta' bejn 10-20 % RTG/RS. Dawn is-sitwazzjonijiet huma spjegati kif ġej: (1) Ma jkun hemm ebda evidenza ta' mutaġeniċità (eż. ebda rispons għad-doża, ebda frekwenza mutanti ogħla minn dawk li dehru fil-meded tal-kontroll negattiv konkorrenti jew tal-isfond storiku, eċċ.) f'sensiela ta' punti ta' *data* fi ħdan RTG/RS ta' 100 % sa 20 % u jkun hemm tal-anqas punt ta' *data* wieħed bejn RTG/RS ta' 20 u 25 %. (2) Ma jkun hemm ebda evidenza ta' mutaġeniċità (eż. ebda rispons għad-doża, ebda frekwenza mutanti ogħla minn dawk li dehru fil-meded tal-kontroll negattiv konkorrenti jew tal-isfond storiku, eċċ.) f'sensiela ta' punti ta' *data* bejn RTG/RS ta' 100 % sa 25 % u jkun hemm ukoll punt ta' *data* negattiv ftit anqas minn RTG/RS ta' 10 %. F'dawn iż-żewġ sitwazzjonijiet, ikun jista' jiġi konkluż li s-sustanza kimika tat-test hi negattiva.

69. Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' rispons posittiv jew negattiv ċar.

70. F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq u/jew biex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-*data* għandha tiġi evalwata b'ġudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. It-twettiq ta' esperiment ripetut possibilment bl-użu tal-kundizzjonijiet sperimentali [eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet biex tiżdied il-probabbiltà ta' kisba ta' punti ta' *data* fi ħdan il-medda ta' RTG/RS ta' 10-20 %, l-użu ta' kundizzjonijiet oħra tal-attivazzjoni metabolika (jiġifieri l-konċentrazzjoni tal-S9 jew l-oriġini tal-S9) u d-durata tat-trattament] jista' jkun utli.

71. F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' *data* jipprekludi milli tinħareġ konklużjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi. Għaldaqstant, ir-rispons tas-sustanza kimika tat-test għandu jiġi konkluż bħala ekwivoku (interpretat bħala bl-istess probabbiltà li jkun pożittiv jew negattiv).

RAPPORT TAT-TEST

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

Sustanza kimika tat-test:

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solvent:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;

— il-perċentwal ta' solvent fil-medium tat-tkabbir finali.

Ċelloli:

Għal kolturi prinċipali tal-Laboratorju:

— it-tip u s-sors taċ-ċelloli, u l-istorja fil-laboratorju tal-ittestjar;

— il-karatteristiċi tal-karjotip u/jew in-numru modali tal-kromożomi;

— il-metodi għaż-żamma tal-kolturi taċ-ċelloli;

— l-assenza tal-mikoplażma;

— il-ħtieġa għall-irdoppjar taċ-ċelloli.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— il-ħsieb wara l-għażla tal-konċentrazzjonijiet u n-numru ta' kolturi taċ-ċelloli; inklużi, eż., *data* dwar iċ-ċitotossiċità u limitazzjonijiet għas-solubbiltà;

— il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni ta' CO_2, il-livell ta' umdità;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tat-tkabbir (eż. µg jew mg/ml jew mM tal-medium tat-tkabbir);

— il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) ta' solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tat-tkabbir;

— it-temperatura ta' inkubazzjoni;

— il-ħin ta' inkubazzjoni;

— id-durata tat-trattament;

— id-densità taċ-ċellula waqt it-trattament;

— it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-taħlita ta' S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' taħlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tat-tkabbir finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9);

— is-sustanzi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali għal kull kundizzjoni tat-trattament;

— it-tul tal-perjodu ta' espressjoni (inkluż in-numru ta' ċelluli miżrugħa, u skedi ta' subkolturi u ta' tagħlif, jekk ikun xieraq);

— l-identità tal-aġent selettiv u l-konċentrazzjoni tiegħu;

— għall-MLA, il-verżjoni użata (tal-agar jew tal-mikropjastri) għandha tkun indikata

— il-kriterji għall-aċċettabbiltà tat-testijiet;

— il-metodi użati biex jingħadd in-numru ta' ċelloli vijabbli u mutanti;

— il-metodi użati għall-kejl taċ-ċitotossiċità;

— kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossiċità u l-metodu użat;

— id-durata tal-ħinijiet ta' inkubazzjoni wara l-pjastrament;

— definizzjoni ta' kolonji li dwarhom jitqiesu l-qies u t-tip (inklużi kriterji għal kolonji "żgħar" u "kbar", kif xieraq);

— il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

— il-metodi użati biex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità, jekk issir, u l-preċipitazzjoni, jekk rilevanti.

Ir-riżultati:

— in-numru ta' ċelloli ttrattati u n-numru ta' ċelloli subkolturati għal kull koltura;

— il-parametri tat-tossiċità (RTG għall-MLA u RS għat-TK6);

— is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-ħin tad-determinazzjoni;

— in-numru ta' ċelloli pjastrati f'medium selettiv u mhux selettiv;

— in-numru ta' kolonji f'medium mhux selettiv u n-numru ta' kolonji reżistenti f'medium selettiv, u l-frekwenzi mutanti relatati;

— is-sejbien tal-qies tal-kolonja għall-kontrolli negattivi u pożittivi u jekk is-sustanza kimika tat-test tkun pożittiva, tal-anqas konċentrazzjoni waħda, u l-frekwenzi mutanti relatati;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— id-*data* tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) konkorrenti;

— id-*data* tal-kontroll negattiv storiku (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) bil-meded, bil-medji u bid-devjazzjonijiet standard; in-numru ta' testijiet li fuqhom huma bbażati l-kontrolli storiċi;

— analiżijiet statistiċi (għal kolturi individwali u għal repliki raggruppati jekk xieraq), u l-valuri p jekk ikun hemm; u għall-MLA, l-evalwazzjoni tal-GEF.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. u Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. u Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. u Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. u Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. u Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Pariġi.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. u O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. u Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. u Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., u Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. u Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. u Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. u Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. u Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. u Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. u Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. u Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. u Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. u Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ −3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan u M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. u Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. u Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. u Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. u Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. u Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. u Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. u Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. u Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. u Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$−3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. u Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+}/^{-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. u DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. u Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. u Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411-416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. u Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Il-manuskritt għadu qed jitħejja).

(38) Lloyd M. u Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. u Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Fi: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z u Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. u Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. u Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. u Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. u Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. u Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. u De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. u Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. u Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. u Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Fi: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. u Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Il-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes, Programm tan-Nazzjonijiet Uniti għall-Ambjent (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. u McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Fi: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91–103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. u Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. u Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. u Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. u Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponibbli fuq: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. u Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. u Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. u Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. u Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. u Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Parigi.

(67) Fleiss J.L., Levin B. u Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Anewġenu: Kwalunkwe sustanza kimika jew proċess li, meta jinteraġġixxu mal-komponenti taċ-ċiklu tad-diviżjoni taċ-ċellola mitotika u mejotika, iwasslu għal anewplojdija f'ċelloli jew f'organiżmi.

Anewplojdija: Kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Mutaġeni li jissostitwixxu l-koppji tal-bażijiet: Sustanzi kimiċi li jikkawżaw sostituzzjoni tal-koppji tal-bażijiet fid-DNA.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Effiċjenza tal-klonazzjoni: Il-perċentwal ta' ċelloli pjastrati f'densità baxxa li kapaċi jikbru f'kolonja li tista' tingħadd.

Klastoġenu: Kwalunkwe sustanza kimika jew proċess li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi f'popolazzjonijiet ta' ċelloli jew ta' organiżmi.

Ċitotossiċità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar, iċ-ċitotossiċità hi identifikata bħala tnaqqis fit-tkabbir totali relattiv (RTG) jew fis-sopravivenza relattiva (RS) għall-MLA u għat-TK6, rispettivament.

Mutazzjoni 'l quddiem: Mutazzjoni ta' ġene mit-tip parentali għall-forma mutanti li tkun toħloq alterazzjoni jew telf tal-attività enzimatika jew tal-funzjoni tal-proteina kodifikata.

Mutaġeni li jibdlu l-qari tal-kodiċi ġenetiku: Sustanzi li jikkawżaw iż-żieda jew it-tħassir ta' koppji tal-bażijiet individwali jew multipli fil-molekula tad-DNA.

Ġenotossiċi: Terminu ġenerali li jinkludi kull tip ta' ħsara fid-DNA jew kromożomika, inkluż ksur tad-DNA, addotti, riarranġamenti, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew fi ħsara kromożomika stabbli.

Rikombinament mitotiku: Matul il-mitożi, ir-rikombinament bejn kromatidi omologi li possibilment jirriżulta fl-induzzjoni ta' ksur tal-ħajta doppja tad-DNA jew f'telf ta' eterożigożità.

Mutaġeniċi: Jipproduċu tibdil ereditarju ta' sekwenza/i tal-koppja ta' bażijiet tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Frekwenza mutanti (MF): L-għadd ta' ċelloli mutanti osservati diviż bl-għadd ta' ċelloli vijabbli.

Ħin tal-espressjoni fenotipika: Il-ħin wara t-trattament li matulu l-alterazzjoni ġenetika tkun fissa fi ħdan il-ġenom u kwalunkwe prodott tal-ġeni preeżistenti jitbattal sal-punt li l-karatteristika fenotipika tinbidel.

Sopravivenza relattiva (RS): RS tintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossiċità relatata mat-trattament fit-TK6. Din hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) relattiva taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament taċ-ċelloli aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kontroll negattiv.

Żvilupp relattiv f'sospensjoni (RSG): Għall-MLA, l-iżvilupp relattiv f'sospensjoni totali fuq jumejn tal-koltura tat-test meta mqabbel mal-iżvilupp f'sospensjoni totali fuq jumejn tal-kontroll negattiv/b'solvent (Clive u Spector, 1975). L-RSG għandu jinkludi l-iżvilupp relattiv tal-koltura tat-test meat mqabbla mal-kontroll negattiv/b'solvent matul il-perjodu tat-trattament.

Żvilupp totali relattiv (RTG): L-RTG jintuża bħala l-kejl taċ-ċitotossiċità relatata mat-trattament fl-MLA. Hu kejl tal-iżvilupp relattiv (għall-kontroll tal-veikolu) tal-kolturi tat-test matul il-fażijiet tat-trattament, tal-espressjoni fuq jumejn u tal-klonazzjoni tal-għażla tal-mutanti tat-test. L-RSG ta' kull koltura tat-test jiġi moltiplikat bl-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva tal-koltura tat-test fil-ħin tal-għażla tal-mutanti u hu espress relattiv għall-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kontroll negattiv/b'solvent (Clive u Spector, 1975).

Frazzjoni tal-fwied S9: Supernatant ta' omoġenat tal-fwied wara ċentrifugazzjoni ta' 9 000g, jiġifieri estratt minn fwied mhux proċessat

Taħlita ta' S9: Taħlita tal-frazzjoni S9 tal-fwied u tal-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metaboliċi.

Żvilupp f'sospensjoni (SG): Iż-żieda tad-drabi fin-numru ta' ċelloli matul il-fażijiet tat-trattament u tal-espressjoni tal-MLA. L-SG hu kkalkolat bil-moltiplikazzjoni taż-żieda tad-drabi fil-jum 1 biż-żieda tad-drabi fil-jum 2 għat-trattament qasir (tlieta jew erba' sigħat). Jekk jintuża trattament fuq 24 siegħa, l-SG ikun iż-żieda tad-drabi matul it-trattament fuq 24 siegħa moltiplikat biż-żidiet tad-drabi fil-jiem 1 u 2 tal-espressjoni.

Kontroll b'solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kolturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent waħdu użat biex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Kontrolli mhux trattati: Kontrolli mhux trattati huma kolturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri la sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu proċessati bl-istess mod bħall-kolturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

Appendiċi 2

FORMULI

Ċitotossiċità

Għaż-żewġ verżjonijiet (tal-agar u tal-mikropjastri) tal-MLA

Iċ-ċitotossiċità hi definita bħala l-Iżvilupp Totali Relattiv (RTG) li jinkludi l-Iżvilupp Relattiv f'Sospensjoni (RSG) matul il-perjodu ta' espressjoni ta' jumejn u l-Effiċjenza Relattiva tal-Klonazzjoni (RCE) miksuba fil-ħin tal-għażla tal-mutanti. RTG, RSG u RCE lkoll huma espressi bħala perċentwal.

Kalkolu tal-RSG: L-Iżvilupp f'Sospensjoni wieħed (SG_1) hu r-rata ta' żvilupp bejn il-jum 0 u l-jum 1 (konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 1 / konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 0) u l-Iżvilupp f'Sospensjoni tnejn (SG_2) hu r-rata ta' żvilupp bejn il-jum 1 u l-jum 2 (konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 2 / konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-jum 1). L-RSG hu l-SG totali (SG_1 x SG_2) għall-koltura trattata meta mqabbla mal-kontroll mhux trattat/b'solvent. Jiġifieri: RSG = [$SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}$] / [$SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}$] L-SG_1 għandu jiġi kkalkolat mill-konċentrazzjoni taċ-ċelloli inizjali użata fil-bidu tat-trattament taċ-ċelloli. Dan jagħti rendikont għal kwalunkwe ċitotossiċità differenzjali li sseħħ fil-koltura/i tat-test matul it-trattament taċ-ċelloli.

L-RCE hi l-effiċjenza relattiva tal-klonazzjoni tal-koltura tat-test meta mqabbla mal-effiċjenza relattiva tal-klonazzjoni tal-kontroll mhux trattat/b'solvent miksuba fil-ħin tal-għażla tal-mutanti.

Żvilupp Totali Relattiv (RTG): RTG=RSG x RCE

TK6

Sopravivenza Relattiva (RS):

Iċ-ċitotossiċità hi evalwata bis-sopravivenza relattiva, jiġifieri l-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) taċ-ċelloli pjastrati eżatt wara t-trattament aġġustata skont kwalunkwe telf ta' ċelloli matul it-trattament meta mqabbla mal-effiċjenza tal-klonazzjoni f'kontrolli negattivi (assenjati sopravivenza ta' 100 %). L-aġġustament għat-telf ta' ċelloli matul it-trattament jista' jiġi kkalkolat bħala:

$$\text{CE Aġġustata} = \text{CE} \times \frac{\textit{Number of cells at the end of treatment}}{\textit{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

L-RS aġġustata għal koltura ttrattata b'sustanza kimika tat-test tiġi kkalkolata bħala:

$$RS = \frac{\textit{Adjusted CE in the treated culture}}{\textit{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

IFrekwenza mutanti kemm għall-MLA kif ukoll għat-TK6

Il-frekwenza mutanti (MF) hi l-effiċjenza tal-klonazzjoni tal-kolonji mutanti f'medium selettiv (CE_M) aġġustata bl-effiċjenza tal-klonazzjoni f'medium mhux selettiv fil-ħin tal-għażla tal-mutanti (CE_V). Jiġifieri, MF=CE_M/CE_V. Il-kalkolu ta' dawn iż-żewġ effiċjenzi tal-klonazzjoni hu deskritt hawn taħt għall-metodi ta' klonazzjoni tal-agar u tal-mikropjastri.

Verżjoni tal-Agar tal-MLA: Fil-verżjoni tal-agar artab tal-MLA, in-numru ta' kolonji fil-pjastra tal-għażla tal-mutanti (C_M) u n-numru ta' kolonji fil-pjastra mhux magħżula jew tal-effiċjenza tal-klonazzjoni (għadd tal-vijabbli) (C_V) jinkisbu bl-għadd dirett tal-kloni. Meta 600 ċellola jiġu pjastrati għall-effiċjenza tal-klonazzjoni (CE) għall-pjastri tal-għażla tal-mutanti (CE_M) u l-pjastri mhux magħżula jew tal-effiċjenza tal-klonazzjoni (għadd tal-vijabbli) (CE_V) u 3 x 10^6 ċelloli jintużaw għall-għażla tal-mutanti,

$$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$CE_V = C_V / 600$$

Verżjoni tal-Mikropjastri tal-MLA u tat-TK6: Fil-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA, C_M u C_V huma determinati bħala l-moltiplikazzjoni tan-numru totali ta' mikropjastri (TW) u n-numru probabbli ta' kolonji għal kull bwejra (P) fil-mikropjastri.

$$C_M = P_M \times TW_M$$

$$CV = P_V \times TW_V$$

Mit-terminu żero tad-distribuzzjoni Poisson (Furth et al., 1981), il-P jingħata permezz ta'

$$P = - \ln (EW / TW)$$

Fejn, EW huma l-bwejriet vojta u TW huma l-bwejriet totali. Għalhekk,

$$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$$

$$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$$

Għall-verżjoni tal-mikropjastri tal-MLA, il-frekwenzi mutanti ta' kolonji żgħar u kbar jiġu kkalkolati b'mod identiku, bl-użu tan-numru rilevanti ta' bwejriet vojta għal kolonji żgħar u kbar.

Għat-TK6, il-frekwenzi mutanti ta' kolonji żgħar u kbar huma bbażati fuq il-mutanti li jidhru kmieni u li jidhru tard.

B.68 **METODU TA' TTESTJAR IN VITRO B'ESPONIMENT GĦAL ĦIN QASIR GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI i) TA' SUSTANZI KIMIĊI LI JINDUĊU ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN U ii) TA' SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW GĦAL ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 491 tal-OECD (2017). Il-metodu ta' ttestjar b'Esponiment għal Ħin Qasir (STE) hu metodu *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi għall-klassifikazzjoni tal-periklu u għat-tikkettar tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn kif ukoll dawk li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal ħsara serja lill-għajnejn jew għal irritazzjoni tal-għajnejn, kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u mir-Regolament 1272/2008 tal-Unjoni Ewropea (UE) dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([62]).

2. Għal ħafna snin, il-potenzjal ta' periklu għall-għajnejn tas-sustanzi kimiċi ġie evalwat primarjament bl-użu ta' test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (TM B.5 (8), ekwivalenti għat-TG 405 tal-OECD). Ġeneralment hu aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test alternattiv *in vitro* uniku mhu se jkun jista' jieħu post bis-sħiħ it-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek biex ibassar il-medda sħiħa ta' risponsi ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn għall-klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet strateġiċi ta' metodi ta' ttestjar alternattivi użati fi ħdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu kapaċi jieħdu post it-test fuq l-għajnejn tal-fniek (2). L-approċċ minn fuq għal isfel hu mfassal għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jkunu mistennija, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, li jkollhom potenzjal għoli ta' irritazzjoni jew li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn. Għall-kuntrarju, l-approċċ minn isfel għal fuq hu mfassal għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jkunu mistennija, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, li ma jikkawżawx irritazzjoni tal-għajnejn suffiċjenti biex ikunu jeħtieġu klassifikazzjoni. Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-STE mhuwiex meqjus li hu sostitut assolut għat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek, hu xieraq biex jintuża bħala parti minn stratepija ta' ttestjar sekwenzjali għall-klassifikazzjoni u għat-tikkettar regolatorji, bħall-approċċ minn fuq għal isfel/minn isfel għal fuq, biex jiġu identifikati mingħajr testijiet ulterjuri (i) sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Kategorija 1 tas-CLP) u (ii) sustanzi kimiċi (eskluži sustanzi ferm volatili u kull sustanza kimika solida oħra li mhix tensjoattiva) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Ebda Kategorija tas-CLP) (1)(2). Madankollu, sustanza kimika li la tkun imbassra li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn (GHS tan-NU/Kategorija 1 tas-CLP) u lanqas tal-GHS tan-NU/tal-Ebda Kategorija tas-CLP (ma tinduċix ħsara serja lill-għajnejn u lanqas irritazzjoni tal-għajnejn) skont il-metodu ta' ttestjar STE tkun teħtieġ testijiet addizzjonali biex tiġi stabbilita klassifikazzjoni definittiva. Barra minn hekk, għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel l-użu tal-STE f'approċċ minn isfel għal fuq skont skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn li mhumiex il-GHS tan-NU/is-CLP. L-għażla tal-aktar metodu ta' ttestjar xieraq u l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jiġu kkunsidrati fil-kuntest tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni għal Ħsara Serja lill-Għajnejn u l-Irritazzjoni tal-għajnejn (14).

3. L-iskop ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-għajnejn fuq il-bażi tal-ħila tagħha li tinduċi ċitotossiċità fil-Metodu ta' ttestjar b'Esponiment għal Ħin Qasir. L-effett ċitotossiku tas-sustanzi kimiċi fuq iċ-ċelloli epiteljali korneali hu modalità ta' azzjoni (MOA) importanti li twassal għal ħsara fl-epitelju korneali u għal irritazzjoni tal-għajnejn. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli fil-metodu ta' ttestjar tal-STE hi vvalutata bil-kejl kwantitattiv, wara l-estrazzjoni miċ-ċelloli, ta' melħ tal-formażan blu prodott miċ-ċelloli ħajjin b'konverżjoni enzimatika tal-kolorant vitali MTT (bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju), magħruf ukoll bħala Bromur tat-Tetrażolju Blu Tjoażolil (3). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli miksuba titqabbel mal-kontroll b'solvent (vijabbiltà relattiva) u tintuża biex jiġi stmat il-periklu potenzjali għall-għajnejn tas-sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata bħala tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP meta ż-żewġ konċentrazzjonijiet ta' 5 % u ta' 0,05 % jirriżultaw f'vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 70 % jew anqas (≤). Għall-kuntrarju, sustanza kimika tiġi mbassra bħala ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP meta ż-żewġ konċentrazzjonijiet ta' 5 % u ta' 0,05 % jirriżultaw f'vijabbiltà taċ-ċelloli ta' aktar minn (>) 70 %.

4. It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jirreferi għal dak li jiġi ttestjat u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-STE għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew ta' taħlitiet. Id-definizzjonijiet huma pprovduti f'dan l-Appendiċi.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

5. Dan il-metodu ta' ttestjar hu bbażat fuq protokoll żviluppat minn Kao Corporation (4), u kien is-suġġett ta' żewġ studji ta' validazzjoni differenti: wieħed mill-Validation Committee of the Japanese Society for Alternative to Animal

([62]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

Experiments (JSAAE) (5) u l-ieħor mill-Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). NICEATM/ICCVAM għamlu rieżami bejn il-pari fuq il-bażi tar-rapporti tal-istudji ta' validazzjoni u dokumenti ta' rieżami ta' sfond fuq il-metodu ta' ttestjar (7).

6. Meta dan jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1), id-*data* miksuba bil-metodu ta' ttestjar tal-STE fuq 125 sustanza kimika (inklużi sustanzi kif ukoll taħlitiet), uriet akkuratezza ġenerali ta' 83 % (104/125), rata ta' pożittivi foloz ta' 1 % (1/86), u rata ta' negattivi foloz ta' 51 % (20/39) meta mqabbel mat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (7). Ir-rata ta' negattivi foloz miksuba mhix kritika f'dan il-kuntest, peress li s-sustanzi kimiċi tat-test kollha li jinduċu vijabbiltà taċ-ċelloli ta' ≤ 70 % f'konċentrazzjoni ta' 5 % u > 70 % f'0,05 % ikunu ttestjati b'mod sussegwenti b'metodi ta' ttestjar *in vivo* oħra validati b'mod adegwat jew, bħala l-aħħar istanza, fit-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji u skont l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali u l-approċċi tal-piż tal-evidenza rakkomandati bħalissa (1) (8). Primarjament ġew ittestjati sustanzi monokostitwenti, għalkemm jeżisti wkoll ammont limitat ta' *data* fuq l-ittestjar ta' taħlitiet. Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda hu teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi u ta' taħlitiet multikostitwenti. Madankollu, qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE ma wera ebda nuqqas speċifiku ieħor meta ntuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi tat-test bħall-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/is-CLP. L-investigaturi jistgħu jikkunsidraw li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar fuq sustanzi kimiċi tat-test, li fih vijabbiltà taċ-ċelloli ta' ≤ 70 % kemm fil-konċentrazzjoni ta' 5 % kif ukoll ta' 0,05 % għandha tiġi aċċettata bħala indikatur ta' rispons li jinduċi ħsara serja lill-għajnejn li għandu jiġi klassifikat bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP mingħajr testijiet ulterjuri.

7. Meta dan jintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn u għal ħsara serja lill-għajnejn (jiġifieri Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP), id-*data* miksuba bil-metodu ta' ttestjar tal-STE fuq 130 sustanza kimika (inklużi sustanzi kif ukoll taħlitiet), uriet akkuratezza ġenerali ta' 85 % (110/130), rata ta' negattivi foloz ta' 12 % (9/73), u rata ta' pożittivi foloz ta' 19 % (11/57) meta mqabbel mat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek (7). Jekk sustanzi ferm volatili u sustanzi solidi għajr it-tensjoattivi jiġu esklużi mis-sett tad-*data*, l-akkuratezza ġenerali titjieb għal 90 % (92/102), ir-rata ta' negattivi foloz għal 2 % (1/54), u l-pożittivi foloz għal 19 % (9/48) (7). Konsegwentement, in-nuqqasijiet potenzjali tal-metodu ta' ttestjar tal-STE, meta jintuża biex jidenifika sustanzi kimiċi tat-test li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn u għal ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP) huma rata għolja ta' negattivi foloz għal i) sustanzi volatili ħafna bi pressjoni tal-fwar ta' aktar minn 6 kPa u ii) Sustanzi kimiċi solidi (sustanzi u taħlitiet) għajr tensjoattivi u taħlitiet komposti minn tensjoattivi biss. Sustanzi kimiċi bħal dawn huma esklużi mid-dominju tal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-STE (7).

8. Minbarra s-sustanzi kimiċi msemmija fil-paragrafu 6 u 7, is-sett ta' *data* ġenerat mill-metodu ta' ttestjar tal-STE fih ukoll *data* interna dwar 40 taħlita li, meta mqabbla mat-test tal-għajnejn *in vivo* Draize, wera akkuratezza ta' 88 % (35/40), rata ta' pożittivi foloz ta' 50 % (5/10), u rata ta' negattivi foloz ta' 0 % (0/30) għat-tbassir ta' taħlitiet li ma jeħtiġux klassifikazzjoni skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP (9). Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-STE jista' jiġi applikat biex jidentifika taħlitiet bħala Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP f'approċċ minn isfel għal fuq bl-eċċezzjoni ta' taħlitiet ta' solidi għajr dawk komposti minn tensjoattivi biss bħala estensjoni tal-limitazzjoni tiegħu għal sustanzi solidi. Barra minn hekk, taħlitiet li fihom sustanzi bi pressjoni tal-fwar oġħla min 6kPa għandhom jiġu evalwati b'attenzjoni biex jiġu evitati sottopreviżjonijiet potenzjali, u għandhom ikunu ġustifikati fuq bażi ta' każ b'każ.

9. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE ma jistax jintuża għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test bħall-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, jew tal-Kategorija 2A (irritazzjoni tal-għajnejn) jew 2B (irritazzjoni ħafifa tal-għajnejn) tal-GHS tan-NU, minħabba n-numru konsiderevoli ta' sustanzi kimiċi tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP sottoprevisti bħala l-Kategorija 2, 2A, jew 2B u sustanzi kimiċi ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP previsti b'mod eċċessiv bħala tal-Kategorija 2, 2A, jew 2B (7). Għal dan il-għan, jista' jkun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet b'metodu xieraq ieħor.

10. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE hu xieraq għal sustanzi kimiċi tat-test li jiġu dissolti jew sospiżi b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina fiżjoloġika, 5 % sulfossidu tad-dimetil (DMSO) f'salina, jew f'żejt minerali. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE mhuwiex xieraq għal sustanzi kimiċi tat-test li huma insolubbli jew li ma jistgħux jiġu sospiżi b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina fiżjoloġika, 5 % DMSO f'salina, jew f'żejt minerali. L-użu ta' żejt minerali fil-metodu ta' ttestjar tal-STE hu possibbli minħabba l-esponiment għal ħin qasir. Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-STE hu xieraq għat-tbassir tal-potenzjal ta' periklu għall-għajnejn ta' sustanzi kimiċi tat-test insolubbli fl-ilma (*eż.* alkoħols jew ketoni xaħmin b'katina twila) dment li dawn ma jkunux jistgħu jitħalltu f'tal-anqas wieħed mit-tliet solventi proposti hawn fuq (4).

11. It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat ([63]) u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-STE għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew ta' taħlitiet.

PRINĊIPJU TAT-TEST

12. Il-metodu ta' ttestjar tal-STE hu bbażat fuq assaġġ *in vitro* bbażat fuq iċ-ċitotossiċità li jsir fuq monosaff konfluwenti ta' ċelloli tal-Kornea tal-Fenek ta' Statens Seruminstitut (SIRC), kolturati f'mikropjastra tal-polikarbonat b'96 bwejra (4). Wara esponiment għal ħames minuti għal sustanza kimika tat-test, iċ-ċitotossiċità tiġi mkejla b'mod kwantitattiv bħala l-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli tal-SIRC bl-użu tal-assaġġ tal-MTT (4). Il-vijabbiltà mnaqqsa taċ-ċelloli tintuża biex tbassar l-effetti avversi potenzjali li jwasslu għal ħsara okulari.

13. Ġie rrapportat li 80 % ta' soluzzjoni mqattra f'għajn fenek jiġi elimenat permezz tal-borża konġuntivali fi żmien tliet sa erba' minuti, filwaqt li aktar minn 80 % ta' soluzzjoni mqattra f'għajn bniedem jiġi eliminat fi żmien minuta sa tnejn (10). Il-metodu ta' ttestjar tal-STE jipprova japprossima dawn il-ħinijiet ta' esponiment u jagħmel użu miċ-ċitotossiċità bħala punt ta' tmiem għall-valutazzjoni tal-firxa tal-ħsara għaċ-ċelloli tal-SIRC wara esponiment għal ħames minuti għas-sustanza kimika tat-test.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

14. Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu ta' ttestjar tal-STE deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jikklassifikaw kif suppost ħdax-il sustanza rakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-medda sħiħa ta' risponsi għal ħsara serja lill-għajnejn jew għal irritazzjoni tal-għajnejn fuq il-bażi tar-riżultati ta' testijiet *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TG 405) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1). Kriterji tal-għażla oħra inkludew li s-sustanzi għandhom ikunu kummerċjalment disponibbli, li għandu jkun hemm *data* ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja, u li għandu jkun hemm disponibbli *data in vitro* ta' kwalità għolja mill-metodu ta' ttestjar (3). F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza elenkata ma tkunx disponibbli jew, fejn ġustifikabbli, tista' tintuża sustanza oħra li għaliha jkun hemm *data* ta' referenza adegwata *in vivo* u *in vitro* disponibbli dment li ma jintużawx l-istess kriterji bħal dawk deskritti hawn.

Tabella 1

Lista ta' Sustanzi ta' Profiċjenza

Sustanza	CASRN	Klassi kimika ([1])	Stat fiżiku	Kat. *In Vivo* tal-GHS tan-NU/tas-CLP ([2])	Solvent fit-test tal-STE	Kat. tal-STE tal-GHS tan-NU/tas-CLP
Klorur tal-benżal-konju (10 %, milwiem)	8001-54-5	Kompost tal-onju	Likwidi	Kategorija 1	Salina	Kategorija 1

([63]) F'Ġunju 2013, il-Laqgħa Konġunta qablet li, fejn possibbli, issa għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu "sustanza kimika tat-test" li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f'metodi ta' ttestjar ġodda u aġġornati.

Sustanza	CASRN	Klassi kimika (1)	Stat fiżiku	Kat. *In Vivo* tal-GHS tan-NU/tas-CLP (2)	Solvent fit-test tal-STE	Kat. tal-STE tal-GHS tan-NU/tas-CLP
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eter	Likwidi	Kategorija 1	Salina	Kategorija 1
Aħmar Aċidu 92	18472-87-2	Kompost eteroċikliku; Kompost tal-bromur; Kompost tal-klorur	Solidu	Kategorija 1	Salina	Kategorija 1
Idrossidu tas-sodju	1310-73-2	Alkali; Sustanza kimika inorganika	Solidu	Kategorija 1 (3)	Salina	Kategorija 1
Butirolatton	96-48-0	Latton; Kompost eteroċikliku	Likwidi	Kategorija 2A (Kategorija 2 fis-CLP)	Salina	Ma tista' ssir ebda previżjoni
1-Ottanol	111-87-5	Alkoħol	Likwidi	Kategorija 2A/B (4) (Kategorija 2 fis-CLP)	Żejt Minerali	Ma tista' ssir ebda previżjoni
Ċiklopentanol	96-41-3	Alkoħol; Idrokarbur, ċikliku	Likwidi	Kategorija 2A/B (5) (Kategorija 2 fis-CLP)	Salina	Ma tista' ssir ebda previżjoni
2-Etossietil aċetat	111-15-9	Alkoħol; Eter	Likwidi	Ebda Kategorija	Salina	Ebda Kategorija
Dodekan	112-40-3	Idrokarbur, aċikliku	Likwidi	Ebda Kategorija	Żejt Minerali	Ebda Kategorija
Metilisobutilketon	108-10-1	Ketone	Likwidi	Ebda Kategorija	Żejt Minerali	Ebda Kategorija

Sustanza	CASRN	Klassi kimika (1)	Stat fiżiku	Kat. *In Vivo* tal-GHS tan-NU/tas-CLP (2)	Solvent fit-test tal-STE	Kat. tal-STE tal-GHS tan-NU/tas-CLP
Sulfat tal-1,1-Dimetilgwanidina	598-65-2	Amidina; Kompost tal-kubrit	Solidu	Ebda Kategorija	Salina	Ebda Kategorija

(1) Il-klassijiet kimiċi ġew assenjati bl-użu tal-informazzjoni miksuba mill-pubblikazzjonijiet preċedenti tal-NICEATM u, jekk din ma kinitx disponibbli, bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH®) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina (permezz ta' ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponibbli fuq http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) u tad-determinazzjonijiet tal-istruttura magħmula minn NICEATM.

(2) Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1).

(3) Klassifikazzjoni bħala l-Kat.1 hi bbażata fuq il-potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda tal-idrossidu tas-sodju 100 % (elenkat bħala sustanza kimika b'potenzjal ta' korrużjoni tal-ġilda fit-TG 435 tal-OECD) u l-kriterju għall-kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (1).

(4) Klassifikazzjoni bħala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri tnejn minn sitta vs erbgħa minn sitt annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi ġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. Is-sett ta' *data in vivo* inkluda żewġ studji bi tliet annimali kull wieħed. Fi studju minnhom tnejn minn tliet annimali wrew effetti fil-jum 7 li kienu jiġġustifikaw klassifikazzjoni tal-Kat. 2A (11), filwaqt li fit-tieni studju l-punti ta' tmiem kollha fit-tliet annimali kollha kemm huma rkupraw għal punteġġ ta' żero sal-jum 7 li ġġustifika klassifikazzjoni tal-Kat. 2B (12).

(5) Klassifikazzjoni bħala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri wieħed minn tlieta vs tnejn minn tliet annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi ġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istuduju *in vivo* kien jinkludi tliet annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-opaċità korneali u l-ħmura konġuntivali f'annimal wieħed irkupraw għal punteġġ ta' żero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkuprax għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' opaċità korneali ta' wieħed u ta' ħmura konġuntivali ta' wieħed (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 14 (11).

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

PROĊEDURA

Preparazzjoni tal-Monosaff Ċellolari

15. Il-linja ta' ċelloli tal-kornea tal-fniek, SIRC, għandha tintuża għat-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-STE. Hu rakkomandat li ċ-ċelloli tal-SRC jinkisbu minn bank taċ-ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection CCL60.

16. Iċ-ċelloli SRC huma kolturati f'37 °C f'5 % CO_2 u atmosfera umidifikata fi flask tal-koltura li fih medium tat-tkabbir li jinvolvi medium essenzjali minimu ta' Eagle (MEM) supplimentat b'10 % serum bovin fetali (FBS), 2 mM L-glutammina, 50–100 unità/ml peniċillina u 50–100 µg/ml streptomiċina. Iċ-ċelloli li saru konfluwenti fil-flask tal-koltura għandhom jiġu separati bl-użu tas-soluzzjoni tal-aċidu tripsina-etilendijamminatetraaċetiku, bl-użu ta' scraper taċ-ċelloli jew mingħajr. Iċ-ċelloli jiġu propagati (eż. minn tnejn sa tliet passaġġi) fi flask tal-koltura qabel ma jintużaw għall-ittestjar ta' rutina, u ma għandhomx isirulhom aktar minn 25 passaġġ mit-taħlil.

17. Iċ-ċelloli li jkunu lesti biex jintużaw għat-test tal-STE mbagħad jitħejjew fid-densità xierqa u jinżergħu fi pjastri b'96 bwejra. Id-densità rakkomandata tat-tiżrigħ taċ-ċelloli hi ta' $6,0 \times 10^3$ ċelloli għal kull bwejra meta ċ-ċelloli jintużaw erbat ijiem wara t-tiżrigħ, jew $3,0 \times 10^3$ ċelloli għal kull bwejra meta ċ-ċelloli jintużaw ħamest ijiem wara t-tiżrigħ, f'volum tal-koltura ta' 200 µl. Iċ-ċelloli użati għat-test tal-STE li jinżergħu f'medium tat-tkabbir fid-densità xierqa jilħqu konfluwenza ta' aktar minn 80 % fil-ħin tal-ittestjar, jiġifieri erba' jew ħamest ijiem wara t-tiżrigħ.

Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u tas-Sustanzi tal-Kontroll

18. L-ewwel għażla tas-solvent għad-dissoluzzjoni jew għas-sospensjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test hi s-salina fiżjoloġika. Jekk is-sustanza kimika tat-test turi solubbiltà baxxa jew ma tkunx tista' tiġi dissolta jew sospiża b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina, 5 % DMSO (CAS#67-68-5) f'salina tintuża bħala s-solvent tat-tieni għażla. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jkunux jistgħu jiġu dissolti jew sospiżi b'mod uniformi għal tal-anqas ħames minuti f'salina jew f'5 % DMSO f'salina, jintuża żejt minerali (CAS#8042-47-5) bħala solvent tat-tielet għażla.

19. Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew sospiżi b'mod uniformi fis-solvent magħżul f'konċentrazzjoni ta' 5 % (w/w) u jiġu dilwiti ulterjorment b'dilwizzjoni serjali ta' 10 darbiet għal konċentrazzjoni ta' 0,5 % u 0,05 %. Kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata f'konċentrazzjonijiet ta' 5 % kif ukoll ta' 0,05 %. Ċelloli kolturati fil-pjastra b'96 bwejra huma esposti għal 200 µl/bwejra f'konċentrazzjoni ta' 5 % jew ta' 0,05 % tas-soluzzjoni (jew sospensjoni) tas-sustanza kimika tat-test, għal ħames minuti f'temperatura ambjentali. Is-sustanzi kimiċi tat-test (sustanzi monokostitwenti jew sustanzi jew taħlitiet multikostitwenti) jitqiesu bħala sustanzi nodfa u dilwiti jew sospiżi skont il-metodu, indipendentement mill-purità tagħhom.

20. Il-medium tat-tkabbir deskritt fil-paragrafu 16 jintuża bħala kontroll b'medium f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Barra minn hekk, iċ-ċelloli jiġu esposti wkoll għal kampjuni b'kontroll b'solvent f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Is-solventi elenkati fil-paragrafu 18 ġew ikkonfermati li ma għandhom ebda effett avvers fuq il-vijabbiltà taċ-ċelloli SIRC.

21. Fil-metodu ta' ttestjar tal-STE, għandu jintuża 0,01 % Sulfat tal-lauril tas-sodju (SLS) f'salina bħala kontroll pożittiv f'kull pjastra ta' kull ripetizzjoni. Biex tiġi kkalkolata l-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-kontroll pożittiv, kull pjastra ta' kull ripetizzjoni trid tinkludi wkoll kontroll b'solvent salina.

22. Inbjank hu neċessarju biex jiġi determinat il-kumpens għad-densità ottika u għandu jsir fuq bwejriet li jkun fihom salina baferjata bil-fosfat biss, iżda ebda kalċju u manjeżju (PBS-) jew ċelloli.

23. Kull kampjun (sustanza kimika tat-test f'5 % u f'0,05 %, il-kontroll b'medium, il-kontroll b'solvent, u l-kontroll pożittiv) għandu jiġi ttestjat f'kull ripetizzjoni bl-esponiment taċ-ċelloli għal 200 µl tas-sustanza kimika tat-test jew tal-kontroll xierqa għal ħames minuti f'temperatura ambjentali.

24. Sustanzi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanzi kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew ta' prodotti jikkawżaw irritazzjoni okulari, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' irritazzjoni relattiva ta' irritant okulari fi ħdan medda speċifika ta' risponsi irritanti.

Kejl tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

25. Wara l-esponiment, iċ-ċelloli jinħaslu darbtejn b'200 µl PBS u tiżdied 200 µl soluzzjoni tal-MTT (0,5 mg MTT/ml medium tat-tkabbir). Wara ħin ta' reazzjoni ta' sagħtejn f'inkubatur (37 °C, 5 % CO_2), is-soluzzjoni tal-MTT tiġi dekantata, il-formażan MTT jiġi estratt billi jiżdiedu 200 µl aċidu isopropanol idrokloriku 0,04 N għal 60 minuta fid-dlam f'temperatura ambjentali, u l-assorbanza tas-soluzzjoni tal-formażan MTT titkejjel f'570 nm b'apparat għall-qari tal-pjastri. L-intereferenza tas-sustanzi kimiċi tat-test mal-assaġġ tal-MTT (minn koloranti jew riduċenti diretti tal-MTT) issehħ biss jekk jinżamm ammont sinifikanti ta' sustanzi kimiċi tat-test fis-sistema tat-test wara t-tlaħliħ wara l-esponiment, li hu l-każ għall-kornea umana Rikostitwita 3D jew tat-Tessuti tal-epidermis uman rikostitwit iżda mhuwiex rilevanti għall-kolturi ta' ċelloli 2D użati għall-metodu ta' ttestjar tal-STE.

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u tat-Tbassir

26. Il-valuri tad-densità ottika (OD) miksuba għal kull sustanza kimika tat-test imbagħad jintużaw biex tiġi kkalkolata l-vijabbiltà taċ-ċelloli għall-kontroll b'solvent, li tiġi stabbilita għal 100 %. Il-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli tiġi espressa bħala perċentwal u tinkiseb bid-diviżjoni tal-OD tas-sustanza kimika tat-test bl-OD tal-kontroll b'solvent wara t-tnaqqis tal-OD tal-inbjank miż-żewġ valuri.

$$Cell\ viability(\%) = \frac{(OD_{570} of\ test\ chemical) - (OD_{570} of\ blank)}{(OD_{570} solvent\ control) - (OD_{570} of\ blank)} \times 100$$

B'mod simili, il-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli ta' kull kontroll b'solvent tiġi espressa bħala perċentwal u tinkiseb bid-diviżjoni tal-OD ta' kull kontroll b'solvent bl-OD tal-kontroll b'medium wara t-tnaqqis tal-OD tal-inbjank miż-żewġ valuri.

27. Għandhom isiru tliet ripetizzjonijiet indipendenti, b'kull waħda li jkun fiha tliet bwejriet repliki (jiġifieri, n=9). Il-medja aritmetika tat-tliet bwejriet għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll b'solvent f'kull ripetizzjoni indipendenti tintuża biex tiġi kkalkolata l-medja aritmetika tal-vijabbiltà relattiva taċ-ċelloli. Il-medja aritmetika finali tal-vijabbiltà taċ-ċelloli tiġi kkalkolata mit-tliet ripetizzjonijiet indipendenti.

28. Il-valuri ta' limitu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) u tas-sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew għal ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP) jingħataw hawnhekk.

Tabella 2

Mudell tat-tbassir tal-metodu ta' ttestjar tal-STE

Vijabbiltà taċ-ċelloli		Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU/tas-CLP	Applikabbiltà
F'5 %	F'0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Ebda Kategorija	Sustanzi u taħlitiet, bl-eċċezzjoni ta': i) sustanzi ferm volatili bi pressjoni tal-fwar ta' aktar minn 6 kPa [1] u ii) Sustanzi kimiċi solidi (sustanzi u taħlitiet) għajr tensjoattivi u taħlitiet komposti minn tensjoattivi biss
≤ 70 %	> 70 %	Ma tista' ssir ebda previżjoni	Mhux applikabbli
≤ 70 %	≤ 70 %	Kategorija 1	Sustanzi u taħlitiet [2]

[1] Taħlitiet li fihom sustanzi bi pressjoni tal-fwar ogħla min 6kPa għandhom jiġu evalwati b'attenzjoni biex jiġu evitati sottopreviżjonijiet potenzjali, u għandhom ikunu ġustifikati fuq bażi ta' każ b'każ.

[2] Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba primarjament b'sustanzi monokostitwenti, għalkemm jeżisti wkoll ammont ta' *data* dwar l-ittestjar ta' taħlitiet. Il-metodu ta' ttestjar xorta waħda hu teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi u ta' taħlitiet multikostitwenti. Qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

Kriterji tal-Aċċettazzjoni

29. Ir-riżultati tat-test huma ġudikati bħala aċċettabbli meta jiġu ssodisfati l-kriterji kollha li ġejjin:

a) Id-densità ottika tal-kontroll b'medium (espost għal medium tat-tkabbir) għandha tkun ta' 0,3 jew aktar wara t-tnaqqis tad-densità ottika tal-inbjank.

b) Il-vijabbiltà tal-kontroll b'solvent għandha tkun 80 % jew aktar relattiva għall-kontroll b'medium. Jekk jintużaw diversi kontrolli b'solvent f'kull ripetizzjoni, kull wieħed minn dawk il-kontrolli għandu juri vijabbiltà taċ-ċelloli akbar minn 80 % biex jiġu kwalitifkati s-sustanzi kimiċi tat-test ittestjati b'dawk is-solventi.

c) Il-vijabbiltà taċ-ċelloli miksuba bil-kontroll pożittiv (0,01 % SLS) għandha tkun fi ħdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika. Il-limiti ta' aċċettazzjoni superjuri u inferjuri għall-kontroll pożittiv għandhom jiġu aġġornati b'mod frekwenti, jiġifieri kull tliet xhur, jew kull darba li jsir test aċċettabbli f'laboratorji fejn it-testijiet isiru b'mod mhux frekwenti (jiġifieri anqas minn darba f'xahar). Meta laboratorju ma jlestix numru suffiċjenti ta' esperimenti biex tiġi stabbilita distribuzzjoni statistikament robusta tal-kontroll pożittiv, hu aċċettabbli li jintużaw il-limiti ta' aċċettazzjoni superjuri u inferjuri stabbiliti mill-iżviluppatur tal-metodu, jiġifieri bejn 21,1 % u 62,3 % skont id-*data* storika tal-laboratorju tiegħu, filwaqt li tinbena distribuzzjoni interna matul l-ewwel testijiet ta' rutina.

d) Id-devjazzjoni standard tal-vijabbiltà finali taċ-ċelloli derivata minn tliet ripetizzjonijiet indipendenti għandha tkun anqas minn 15 % għall-konċentrazzjoni ta' 5 % kif ukoll ta' 0,05 % tas-sustanza kimika tat-test.

Jekk ma jiġix issodisfat wieħed jew aktar minn dawn il-kriterji, ir-riżultati għandhom jiġu injorati u jsiru tliet ripetizzjonijiet indipendenti oħra.

DATA U RAPPORTAR

Data

30. Id-*data* għal kull bwejra individwali (eż. il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli) ta' kull ripetizzjoni kif ukoll il-medja ġenerali, l-SD, u l-klassifikazzjoni jridu jiġu rapportati.

Rapport tat-Test

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

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi tal-Kontroll

— Sustanza monokostitwenti: l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-reġistru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita: Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli skont, pereżempju, l-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn disponibbli;

— L-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, il-LogP, il-piż molekulari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, tħin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

Kundizzjonijiet u Proċeduri tal-Metodu ta' Ttestjar

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tal-metodu ta' ttestjar użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, is-sors tagħha, in-numru ta' passaġġi u l-konfluwenza taċ-ċelloli użati għall-ittestjar;

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata;

— In-numru ta' ripetizzjonijiet u ta' repliki użati;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test użati (jekk differenti minn dawk rakkomandati);

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;

— Id-durata tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (jekk differenti minn dik rakkomandata);

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' deċiżjoni użati;

— Referenza għall-medja tal-kontroll pożittiv storiku u għad-Devjazzjoni Standard (SD):

— - Wiri ta' profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza) jew bil-wiri ta' prestazzjoni riproduċibbli tal-metodu ta' ttestjar maż-żmien.

Riżultati

— Għal kull sustanza kimika tat-test u sustanza tal-kontroll, u kull konċentrazzjoni ttestjata, it-tabulazzjoni għandha tingħata għall-valuri indivdiwali tal-OD għal kull bwejra replikata, għall-valuri medji aritmetiċi tal-OD għal kull ripetizzjoni indipendenti, il- % tal-vijabbiltà taċ-ċelloli għal kull ripetizzjoni indipendenti, u l- % medju aritmetiku finali tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u l-SD fit-tliet ripetizzjonijiet;

— Ir-riżultati għall-medium, għas-solvent u għall-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tal-istudji;

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

— Il-klassifikazzjoni ġenerali derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir/għall-kriterji tad-deċiżjoni użati.

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) Nazzjonijiet Uniti NU (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Disponibbli fuq: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/Korrużjoni Akuta tal-Għajnejn.

(9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS u Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm.* Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442-449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Parigi.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Parigi.

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (13).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għsll-klassi ta' sustanzi ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) *data* ta' sostenn dwar l-effetti magħrufa, u (v) il-potenza magħrufa fil-medda tar-rispons mixtieq.

Approċċ Minn Isfel Għal Fuq: Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li ma teħtieġx klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv)

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Irritazzjoni tal-għajnejn: Il-produzzjoni ta' tibdil fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ ta' wara tal-għajn, li jkun kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "effetti reversibbli fuq l-għajnejn" u mal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon ta' sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' foloz pożittivi: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

Kontroll b'medium: Replika mhux trattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn biex jiġi determinat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

MTT: Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

OD: Densità Ottika.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tinduċi rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (10).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (13).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (10).

Ħsara serja lill-għajnejn: Il-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-għajnejn, jew ta' tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje tal-għajn, li ma jkunux riversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "effetti irreversibbli fuq l-għajn" u mal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

Kontroll b'solvent/veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi proċessat mal-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħra biex jiġi stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (13).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull additttiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Tensjoattiv: Imsejjaħ ukoll aġent tensjoattiv, dan hu sustanza kimika, bħal deterġent, li tista' tnaqqas it-tensjoni tas-superfiċje ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtella' r-ragħwa jew jippenetra solidi; hu magħruf ukoll bħala aġent li jxarrab.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali: Strateġija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi rieżaminata, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell biex jiġi determinat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Approċċ Minn Fuq Għal Isfel: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħra (eżitu negattiv).

Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP: Ara "Ħsara serja lill-għajnejn".

Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP: Ara "Irritazzjoni tal-għajnejn".

Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP: Sustanzi kimiċi li mhumiex klassifikati bħala tal-Kategorija 1 jew 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (jew tal-Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU).

UVCB: sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

B.69 METODU TA' TTESTJAR TAL-EPITELJU BĦALL-KORNEA UMANA RIKOSTITWITA (RhCE) GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI U TIKKETTAR GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW GĦAL ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 492 tal-OECD (2017). *Ħsara serja lill-għajnejn* tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut tal-għajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunux riversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni, kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (CLP) ([1]). Skont il-GHS tan-NU u s-CLP ukoll, *irritazzjoni tal-għajnejn* tirreferi għall-produzzjoni ta' tibdil fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ ta' wara tal-għajn, li jkun kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn huma klassifikati bħala tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP, filwaqt li dawk li jinduċu irritazzjoni tal-għajnejn huma klassifikati bħala tal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP. Is-sustanzi kimiċi tat-test mhux klassifikati għal irritazzjoni tal-għajnejn jew għal ħsara serja lill-għajnejn huma definiti bħala dawk li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU u tas-CLP, jiġifieri huma msejħa bħala tal-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP.

2. Il-valutazzjoni ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn tipikament kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju (TM B.5 (2)). L-għażla tal-aktar metodu ta' ttestjar xieraq u l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għandhom jiġu kkunsidrati fil-kuntest tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar Approċċi Integrati dwar l-Ittestjar u l-Valutazzjoni għal Ħsara Serja lill-Għajnejn u l-Irritazzjoni tal-għajnejn (39).

3. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi proċedura *in vitro* li tippermetti li jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għal ħsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU u s-CLP. Juża l-epitelju bħall-kornea umana rikostitwita (RhCE) li jimita mill-qrib il-proprjetajiet istoloġiċi, morfoloġiċi, bijokimiċi u fiżjoloġiċi tal-epitelju korneali uman. Ġew validati erba' metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra, meqjusa xjentifikament validi u adottati bħala t-TM B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) u B.68 (6) biex jindirizzaw il-punt ta' tmiem tas-saħħa tal-bniedem ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn.

4. F'dan il-metodu ta' ttestjar huma inklużi żewġ testijiet validati li jużaw mudelli RhE kummerċjalment disponibbli. Saru studji ta' validazzjoni għall-valutazzjoni ta' irritazzjoni tal-għajnejn/ħsara serja lill-għajnejn (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13) bl-użu ta' EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) u ta' SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Kull wieħed minn dawn it-testijiet jagħmel użu minn binjiet ta' tessut tal-RhCE kummerċjalment disponibbli bħala sistema tat-test, li huma riferiti fit-test li ġej bħala l-Metodi ta' Referenza Validati – VRM 1 u VRM2, rispettivament. Minn dawn l-istudji ta' validazzjoni u mir-rieżami bejn il-pari indipendenti tagħhom (9)(12), ġie konkluż li EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT kapaċi jidentifikaw kif suppost sustanzi kimiċi (kemm sustanzi kif ukoll taħlitiet) li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU, u t-testijiet ġew rakkomandati bħala xjentifikament validi għal dak l-iskop (13).

5. Bħalissa ġeneralment hu aċċettat li, fil-futur qarib, ebda metodu ta' ttestjar *in vitro* uniku mhu se jkun jista' jieħu post bis-sħiħ it-test tal-għajnejn *in vivo* Draize (2)(14) biex ibassar il-medda sħiħa ta' risponsi ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn għall-klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet strateġiċi ta' diversi metodi ta' ttestjar alternattivi fi ħdan strateġiji ta' ttestjar (sekwenzjali) bħall-approċċ minn Isfel għal Fuq/minn Fuq għal Isfel jaf ikunu kapaċi jieħdu post it-test Draize tal-għajnejn għalkollox (15). L-approċċ minn Isfel għal Fuq (15) hu mfassal biex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija ma tikkawżawx irritazzjoni tal-għajnejn suffiċjenti biex teħtieġ klassifikazzjoni, filwaqt li l-approċċ minn Fuq għal Isfel (15) hu mfassal biex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija tikkawża ħsara serja lill-għajnejn. EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT huma rakkomandati biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn skont (Ebda Kategorija) il-GHS tan-NU/is-CLP mingħajr ittestjar ulterjuri, fi ħdan strateġija ta' ttestjar bħall-approċċ minn Isfel għal Fuq/minn

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

Fuq għal Isfel suġġerit minn Scott *et al*. eż. bħala pass inizjali f'approċċ minn Isfel għal Fuq jew bħala wieħed mill-aħħar passi f'approċċ minn Fuq għal Isfel (15). Madankollu, EpiOcular™ EIT u SkinEthic™ HCE EIT mhumiex maħsuba biex jagħmlu distinzjoni bejn il-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (ħsara serja lill-għajnejn) u l-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (irritazzjoni tal-għajnejn). Din id-differenzazzjoni se jkollha bżonn tiġi indirizzata minn saff ieħor ta' strateġija tat-test (15). B'hekk, sustanza kimika tat-test li tiġi identifikata bħala waħda li teħtieġ klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn/ħsara serja lill-għajnejn b'EpiOcular™ EIT jew SkinEthic™ HCE EIT se tkun teħtieġ ittestjar addizzjonali (*in vitro* u/jew *in vivo*) biex tinkiseb konklużjoni definittiva (Ebda Kategorija, Kategorija 2 jew Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP), billi jintuża, eż., it-TM B.47, B.48, B.61 jew B.68.

6. L-iskop ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jiddeskrivi l-proċedura użata għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-għajnejn fuq il-bażi tal-ħila tagħha li tinduċi ċitotossiċità f'binja tat-tessut tal-RhCE, kif imkejla mill-assaġġ tal-MTT (16) (ara l-paragrafu 21). Il-vijabbiltà tat-tessut tal-RhCE wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test hi determinata meta dawn jitqabblu ma' tessuti trattati bis-sustanza tal-kontroll negativ (% vijabbiltà), u mbagħad tintuża biex jitbassar il-potenzjal ta' periklu tas-sustanza kimika tat-test għall-għajnejn.

7. Hemm standards tal-prestazzjoni (17) disponibbli biex jiffaċilitaw il-validazzjoni ta' testijiet *in vitro* ġodda jew modifikati bbażati fuq l-RhCE simili għal EpiOcular™ EIT u għal SkinEthic™ HCE EIT, skont il-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 34 (18), u jippermettu għall-emendar puntwali tat-TG 492 tal-OECD għall-inklużjoni tagħhom. Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* (MAD) skont il-ftehim tal-OECD se tkun garantita biss għal testijiet validati skont l-istandards tal-prestazzjoni, jekk dawn it-testijiet ikunu ġew rieżaminati u inklużi fil-linja gwida tat-test korrispondenti mill-OECD.

DEFINIZZJONIJIET

8. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

9. Dan il-metodu ta' ttestjar hu bbażat fuq binjiet tat-tessuti tal-RhCE tridimensjonali kummerċjali li huma prodotti bl-użu ta' keratinoċiti epidermali umani primarji (jiġifieri EpiOcular™ OCL-200) jew ċelloli epiteljali korneali immortalizzati umani (jiġifieri SkinEthic™ HCE/S). Il-binjiet tat-tessuti EpiOcular™ OCL-200 u SkinEthic™ HCE/S RhCE huma simili għall-istruttura tridimensjonali tal-epitelju korneali *in vivo* u huma prodotti bl-użu ta' ċelloli mill-ispeċijiet ta' interess (19)(20). Barra minn hekk, it-testijiet ikejlu b'mod dirett iċ-ċitotossiċità li tirriżulta mill-penetrazzjoni tas-sustanza kimika permezz tal-kornea u mill-produzzjoni ta' ħsara fiċ-ċelloli u fit-tessuti; ir-rispons ċitotossiku mbagħad jiddetermina l-eżitu *in vivo* ġenerali ta' ħsara serja lill-għajnejn/ta' irritazzjoni tal-għajnejn. Il-ħsara fiċ-ċelloli tista' sseħħ b'diversi modalitajiet ta' azzjoni (ara l-paragrafu 20), iżda ċ-ċitotossiċità taqdi rwol mekkanistiku importanti, jekk mhux dak primarju, fid-determinazzjoni tar-rispons ġenerali ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanza kimika, muri *in vivo* primarjament minn opaċità korneali, irite, ħmura konġuntivali u/jew kemoża konġuntivali, indipendentement mill-proċessi fiżikokimiċi li huma fil-bażi tal-ħsara fit-tessuti.

10. Medda wiesgħa ta' sustanzi kimiċi, li tkopri varjetà kbira ta' tipi ta' sustanzi kimiċi, ta' klassijiet ta' sustanzi kimiċi, ta' piżijiet molekolari, ta' LogPs, ta' strutturi ta' sustanzi kimiċi, eċċ., ġiet ittestjata fl-istudju ta' validazzjoni li hu l-bażi ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Il-bażi ta' *data* ta' validazzjoni ta' EpiOcular™ EIT kien fiha 113-il sustanza kimika b'kollox, li jkopru 95 grupp funzjonali organiku differenti skont analiżi tas-sett ta' għodod tal-QSAR tal-OECD (8). Il-maġġoranza ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienet tirrappreżenta sustanzi monokostitwenti, iżda diversi sustanzi multikostitwenti (inklużi 3 omopolimeri, 5 kopolimeri u 10 kważi polimeri) ġew inklużi wkoll fl-istudju. F'termini tal-istat fiżiku u tal-Kategoriji tal-GHS tan-NU/tas-CLP, il-113-il sustanza kimika ttestjati ġew distribwiti kif ġej: 13-il likwidu tal-Kategorija 1, 15-il solidu tal-Kategorija 1, 6 likwidi tal-Kategorija 2A, 10 solidi tal-Kategorija 2A, 7 likwidi tal-Kategorija 2B, 7 solidi tal-Kategorija 2B, 27 likwidu ta' Ebda Kategorija u 28 solidu ta' Ebda Kategorija (8). Il-bażi ta' *data* ta' validazzjoni ta' SkinEthic™ HCE EIT kien fiha 200 sustanza kimika b'kollox, li jkopru 165 grupp funzjonali organiku differenti (8)(10)(11). Il-maġġoranza ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienet tirrappreżenta sustanzi monokostitwenti, iżda diversi sustanzi multikostitwenti (inklużi 10 polimeri) ġew inklużi wkoll fl-istudju. F'termini tal-istat fiżiku u tal-Kategoriji tal-GHS tan-NU/tas-CLP, il-200-il sustanza kimika ttestjati ġew distribwiti kif ġej: 27 likwidu tal-Kategorija 1, 24 solidu tal-Kategorija 1, 19-il likwidu tal-Kategorija 2A, 10 solidi tal-Kategorija 2A, 9 likwidi tal-Kategorija 2B, 8 solidi tal-Kategorija 2B, 50 likwidu ta' Ebda Kategorija u 53 solidu ta' Ebda Kategorija (10)(11).

11. Dan il-metodu ta' ttestjar hu applikabbli għal sustanzi u għal taħlitiet, u għal solidi, għal likwidi, għal semisolidi u għal xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu mitħuna fi trab fin qabel ma jiġu applikati; mhu meħtieġ ebda pretrattament ieħor tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols ma ġewx ivvalutati fi studju ta' validazzjoni. Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhCE, il-metodu ta' ttestjar attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u ta' aerosols.

12. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħal MTT formażan (naturalment jew wara t-trattament) u s-sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu direttament l-MTT tal-kulurant vitali (għal MTT formażan) jistgħu jinterferixxu mal-kejlijiet tal-vijabbiltà tat-tessut u jkollhom bżonn l-użu ta' kontrolli adattati għall-korrezzjonijiet. It-tip ta' kontrolli adattati li jistgħu jkunu meħtieġa se jvarja skont it-tip ta' interferenza prodotta mis-sustanza kimika tat-test u l-proċedura użata biex jiġi kwantifikat l-MTT formażan (ara l-paragrafi 36-42).

13. Ir-riżultati ġenerati fl-istudji ta' prevalidazzjoni (21)(22) u ta' validazzjoni sħiħa (8)(10)(11) urew li kemm EpiOcular™ EIT kif ukoll SkinEthic™ HCE EIT huma trasferibbli għal laboratorji meqjusa li jkunu għadhom ġodda fit-twettiq tal-assaġġi u li huma wkoll riproduċibbli fi ħdan u bejn il-laboratorji. Fuq il-bażi ta' dawn l-istudji, il-livell ta' riproduċibbiltà f'termini ta' konkordanza tat-tbassiriet li jistgħu jkunu mistennija minn EpiOcular™ EIT minn *data* dwar 113-il sustanza kimika hu fl-ordni ta' 95 % fi ħdan il-laboratorji u ta' 93 % bejn il-laboratorji. Il-livell ta' riproduċibbiltà f'termini ta' konkordanza tat-tbassiriet li jistgħu jkunu mistennija minn SkinEthic™ HCE EIT minn *data* dwar 120 sustanza kimika hu fl-ordni ta' 92 % fi ħdan il-laboratorji u ta' 95 % bejn il-laboratorji.

14. EpiOcular™ EIT jista' jintuża biex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u s-CLP. Fid-dawl tad-*data* miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (8), EpiOcular™ EIT għandu akkuratezza ġenerali ta' 80 % (fuq il-bażi ta' 112-il sustanza kimika), sensittività ta' 96 % (fuq il-bażi ta' 57 sustanza kimika), rata ta' negattivi foloz ta' 4 % (fuq il-bażi ta' 57 sustanza kimika), speċifiċità ta' 63 % (fuq il-bażi ta' 55 sustanza kimika) u rata ta' pożittivi foloz ta' 37 % (fuq il-bażi ta' 55 sustanza kimika), meta mqabbel mad-*data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) klassifikata skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP. Studju li fih 97 formulazzjoni agrokimika likwida ġew ittestjati b'EpiOcular™ EIT wera prestazzjoni simili tal-metodu ta' ttestjar għal dan it-tip ta' taħlitiet kif miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (23). Is-97 formulazzjoni kienu distribwiti kif ġej: 21 tal-Kategorija 1, 19 tal-Kategorija 2A, 14 tal-Kategorija 2B u 43 tal-Ebda Kategorija, klassifikati skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU fuq il-bażi ta' *data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14). Inkisbu akkuratezza ġenerali ta' 82 % (fuq il-bażi ta' 97 formulazzjoni), sensittività ta' 91 % (fuq il-bażi ta' 54 formulazzjoni), rata ta' negattivi foloz ta' 9 % (fuq il-bażi ta' 54 formulazzjoni), speċifiċità ta' 72 % (fuq il-bażi ta' 43 formulazzjoni) u rata ta' pożittivi foloz ta' 28 % (fuq il-bażi ta' 43 formulazzjoni) (23).

15. SkinEthic™ HCE EIT jista' jintuża biex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u s-CLP. Fid-dawl tad-*data* miksuba fl-istudju ta' validazzjoni (10)(11), SkinEthic™ HCE EIT għandu akkuratezza ġenerali ta' 84 % (fuq il-bażi ta' 200 sustanza kimika), sensittività ta' 95 % (fuq il-bażi ta' 97 sustanza kimika), rata ta' negattivi foloz ta' 5 % (fuq il-bażi ta' 97 sustanza kimika), speċifiċità ta' 72 % (fuq il-bażi ta' 103 sustanzi kimiċi) u rata ta' pożittivi foloz ta' 28 % (fuq il-bażi ta' 103 sustanzi kimiċi), meta mqabbel mad-*data* ta' referenza tat-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) klassifikata skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP.

16. Ir-rati ta' negattivi foloz miksuba biż-żewġ testijiet tal-RhCE, b'sustanzi jew inkella b'taħlitiet, jaqgħu fi ħdan il-probabbiltà ġenerali ta' 12 % li s-sustanzi kimiċi jiġu identifikati bħala tal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP u tal-Ebda Kategorija tas-CLP mit-test *in vivo* tal-għajnejn Draize, f'testijiet ripetuti; dan hu dovut għall-varjabbiltà

inerenti fi ħdan it-test tal-metodu (24). Ir-rati ta' pożittivi foloz miksuba biż-żewġ metodi ta' ttestjar tal-RhCE b'sustanzi jew inkella b'taħlitiet mhumiex kritiċi fil-kuntest ta' dan il-metodu ta' ttestjar peress li s-sustanzi kimiċi tat-test kollha li jipproduċu vijabbiltà tat-tessuti daqs jew anqas mil-limiti stabbiliti (ara l-paragrafu 44) se jkunu jeħtieġu ttestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra, jew bħala l-aħħar rikors fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ ta' piż tal-evidenza. Dawn il-metodi ta' ttestjar jistgħu jintużaw għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, li bihom għandu jinkiseb riżultat negattiv talli sustanza kimika ma tiġix klassifikata għal irritazzjoni tal-għajnejn u għal ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NUu tas-CLP). Għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel l-użu ta' EpiOcular™ EIT u ta' SkinEthic™ HCE EIT skont skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn li mhumiex il-GHS tan-NU/is-CLP.

17. Limitazzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li ma jippermettix għal diskriminazzjoni bejn irritazzjoni tal-għajn/effetti riversibbli fuq l-għajn (Kategorija 2) u ħsara serja lill-għajn/effetti irriversibbli fuq l-għajn (Kategorija 1) kif definiti mill-GHS tan-NU u mis-CLP, u lanqas bejn irritanti tal-għajn (Kategorija 2A fakultattiva) u irritanti ħfief tal-għajn (Kategorija 2B fakultattiva), kif definiti mill-GHS tan-NU (1). Għal dawn l-għanijiet ikun meħtieġ ittestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar *in vitro* oħra.

18. It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat ([2]) u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-RhCE għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew ta' taħlitiet.

PRINĊIPJU TAT-TEST

19. Is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq il-ġilda ta' tal-anqas żewġ binjiet tat-tessut tal-RhCE tridimensjonali u l-vijabbiltà tat-tessuti titkejjel wara l-esponiment u perjodu inkubazzjoni ta' wara t-trattament. It-tessuti tal-RhCE jiġu rikostitwiti minn keratinoċiti epidermali umani primarji jew minn ċelloli epiteljali korneali immortalizzati umani, li jkunu ġew kolturati għal diversi ġranet biex jifformaw epitelju skwamuż differenzjat ħafna u stratifikat li jkun morfoloġikament simili għal dak li jinstab fil-kornea umana. Il-binja tat-tessut tal-RhCE EpiOcular™ tikkonsisti f'tal-anqas 3 saffi vijabbli ta' ċelloli u f'wiċċ mhux keratinizzat, u turi struttura bħall-kornea analoga għal dik misjuba *in vivo*. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE SkinEthic™ HCE tikkonsisti f'tal-anqas 4 saffi vijabbli ta' ċelloli li jinkludu ċelloli bażali kolonnari, ċelloli transizzjonali tal-ġwienaħ u ċelloli skwamużi superfiċjali simili għal dawk tal-epitelju korneali uman normali (20)(26).

20. Ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn indotta kimikament, manifestata *in vivo* primarjament minn opaċità korneali, minn irite, minn ħmura konġuntivali u/jew minn kemoża konġuntivali, hi r-riżultat ta' diversi avvenimenti li jibdew bil-penetrazzjoni tas-sustanza kimika fil-kornea u/jew fil-konġuntiva u bil-produzzjoni ta' ħsara fiċ-ċelloli. Il-ħsara fiċ-ċelloli tista' sseħħ b'diversi modalitajiet ta' azzjoni, li jinkludu: liżi tal-membrana taċ-ċelloli (eż. minn tensjoattivi, minn solventi organiċi); koagulazzjoni ta' makromolekoli (b'mod partikolari proteini) (eż. minn tensjoattivi, minn solventi organiċi, minn alkalis u minn aċidi); saponifikazzjoni ta' lipidi (eż. minn alkali); u alkilazzjoni jew interazzjonijiet kovalenti oħra b'makromolekoli (eż. minn bliċis, perossidi u alkilaturi) (15)(27)(28). Madankollu, intwera li ċ-ċitotossiċità taqdi rwol mekkanistiku importanti, jekk mhux primarju, fid-determinazzjoni tar-rispons ġenerali għall-ħsara serja lill-għajnejn/għall-irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanza kimika, indipendentement mill-proċessi fiżikokimiċi li huma l-bażi tal-ħsara fit-tessut (29)(30). Barra minn hekk, il-potenzjal ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanza kimika hu primarjament determinat mill-firxa ta' korriment inizjali (31), li tikkorrelata mal-firxa ta' mewt ta' ċelloli (29) u mal-firxa tar-risponsi sussegwenti u tal-eżiti eventwali (32). B'hekk, irritanti ħfief ġeneralment jaffettwat biss l-epitelju korneali superfiċjali, l-irritanti ħfief u moderata jagħmlu ħsara primarjament lill-epitelju u lill-istroma superfiċjali u l-irranti severi jagħmlu ħsara lill-epitelju, lill-istroma fonda u kultant lill-endotelju korneali (30)(33). Il-kejl tal-vijabbiltà tal-binja tat-tessuti tal-RhCE wara l-esponiment topiku għal sustanza kimika tat-test biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP) hu bbażat fuq is-suppożizzjoni li s-sustanzi kimiċi kollha li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn jew irritazzjoni tal-għajnejn jinduċu ċitotossiċità fl-epitelju korneali u/jew fil-konġuntiva.

([2]) F'Ġunju 2013, il-Laqgħa Konġunta tal-OECD qablet li, fejn possibbli, issa għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu "sustanza kimika tat-test" li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f'linji gwida tat-test ġodda u aġġornati tal-OECD.

21. Il-vijabbiltà tat-tessuti tal-RhCE titkejjel b'konverżjoni enzimatika tal-kulurant vitali MTT [Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5- difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil; Numru CAS 298-93-1] miċ-ċelloli vijabbli tat-tessut f'melħ tal-formażan MTT blu li jitkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (16). Sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar (Ebda Kategorija) tal-GHS tan-NU/tas-CLP huma identifikati bħala dawk li ma jnaqqsux il-vijabbiltà tat-tessuti f'livell anqas minn limitu definit (jiġifieri vijabbiltà tat-tessuti ta' > 60 %, f'EpiOcular™ EIT u fi SkinEthic™ HCE EITL ([73]), jew ta' > 50 %, fi SkinEthic™ HCE EITS ([74])) (ara l-paragrafu 44).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

22. Qabel l-użu ta' rutina ta' testijiet tal-RhCE għal finijiet regolatorji, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jbassru kif suppost il-ħmistax-il sustanza kimika ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħażlu mis-sustanzi kimiċi użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-VRMs (8)(10)(11). L-għażla, sa fejn possibbli, tinkludi sustanzi kimiċi li: (i) ikopru stati fiżiċi differenti; (ii) ikopru l-medda sħiħa ta' risponsi *in vivo* ta' ħsara serja lill-għajnejn/irritazzjoni tal-għajnejn fuq il-bażi ta' riżultati ta' kwalità għolja miksuba fit-test *in vivo* ta' referenza fuq għajnejn il-fniek (TM B.5) (2)(14) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Ebda Kategorija) (1) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tas-CLP (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2 jew Ebda Kategorija); (iii) ikopru d-diversi fatturi *in vivo* tal-klassifikazzjoni (24)(25); (iv) huma rappreżentattivi tal-klassijiet kimiċi użati fl-istudju ta' validazzjoni (8)(10)(11); (v) ikopru rappreżentazzjoni tajba u wiesgħa ta' gruppi funzjonali organiċi (8)(10)(11); (vi) għandhom strutturi kimiċi li huma definiti sew (8)(10)(11); (vii) huma kkuluriti u/jew riduċenti diretti tal-MTT; (viii) ipproduċew riżultati riproduċibbli fil-metodi ta' ttestjar tal-RhCE matul il-validazzjonijiet tagħhom; (ix) tbassru kif suppost mill-metodi ta' ttestjar tal-RhCE matul l-istudji ta' validazzjoni tagħhom; (x) ikopru l-medda sħiħa ta' risponsi *in vitro* fuq il-bażi ta' *data* ta' kwalità għolja tal-metodi ta' ttestjar tal-RhCE (vijabbiltà ta' 0 sa 100 %); (xi) huma kummerċjalment disponibbli; u (xii) mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi ta' xiri u/jew ta' rimi. F'sitwazzjonijiet li fihom sustanza kimika elenkata ma tkunx disponibbli jew ma tkunx tista' tintuża għal raġunijiet ġustifikati oħra, tista' tintuża sustanza kimika oħra li tissodisfa l-kriterji deskritti hawn fuq, eż. mis-sustanzi kimiċi użati fil-validazzjoni tal-VRM. Madankollu, devjazzjonijiet bħal dawn għandhom ikunu ġustifikati.

Tabella 1

Lista ta' sustanzi kimiċi ta' profiċjenza

Isem Kimiku	CASRN	Grupp Funzjonali Organiku ([1])	Stat Fiżiku	Vijabbiltà tal-VRM1 (%) ([2])	Vijabbiltà tal-VRM2 (%) ([3])	Tbassir tal-VRM	Riduċent tal-MTT	Interf. tal-kulur
Kategorija *In Vivo* 1 ([4])								
Metiltjoglikolat	2365-48-2	Ester tal-aċidu karbossiliku; Tjoalkoħol	L	10,9±6,4	5,5±7,4	Ma tista' ssir ebda previżjoni	Y (b'saħħtu)	L
Akrilat tal-idrossietil	818-61-1	Akrilat; Alkoħol	L	7,5±4,7 ([5])	1,6±1,0	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
2,5-Dimetil-2,5-eżanedjol	110-03-2	Alkoħol	S	2,3±0,2	0,2±0,1	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
Ossalat tas-sodju	62-76-0	Aċidu ossokarbossiliku	S	29,0±1,2	5,3±4,1	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
Kategorija In Vivo 2A ([4])								
2,4,11,13-Tetraażatetradekandiimidammid, N,N″-bis(4-klorofenil)-3,12-diimino-, di-D-glukonat (20 %, milwiem) ([6])	18472-51-0	Aloġenur eteroċikliku aromatiku; Aloġenur tal-aril; Grupp tad-diidrossil; Gwanidina	L	4,0±1,1	1,3±0,6	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	Y (dgħajjef)

([73]) EITL: EIT għal likwidi fil-każ ta' SkinEthic™ HCE
([74]) EITS: EIT għal solidi fil-każ ta' SkinEthic™ HCE

Isem Kimiku	CASRN	Grupp Funzjonali Organiku ([1])	Stat Fiżiku	Vijabbiltà tal-VRM1 (%) ([2])	Vijabbiltà tal-VRM2 (%) ([3])	Tbassir tal-VRM	Riduċent tal-MTT	Interf. tal-kulur
Benżoat tas-sodju	532-32-1	Aril; Aċidu karbos-siliku	S	3,5±2,6	0,6±0,1	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
Kategorija In Vivo 2B ([4])								
Dietil toluammid	134-62-3	Benżammid	L	15,6±6,3	2,8±0,9	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
2,2-Dimetil-3-metilenbiċiklo [2.2.1] ettan	79-92-5	Alkan, ramifikat b'karbonju terzjarju; Alken; Biċikloettan; Karboċikli bi ċrieki pont; Ċikloalkan	S	4,7±1,5	15,8±1,1	Ma tista' ssir ebda previżjoni	L	L
Ebda Kategorija *In Vivo* ([4])								
1-Etil-3-metilimi-dażolju etilsulfat	342573-75-5	Alkossi; Melħ tal-ammonju; Aril; Imidażol; Sulfat	L	79,9±6,4	79,4±6,2	Ebda Kat	L	L
Eter tad-dikaprilil	629-82-3	Alkossi; Eter	L	97,8±4,3	95,2±3,0	Ebda Kat	L	L
Butossidu tal-pipe-ronil	51-03-6	Alkossi; Benżodios-sol; Benżil; Eter	L	104,2±4,2	96,5±3,5	Ebda Kat	L	L
Żejt tar-riġnu idroġenat tal-glikol tal-polietilen (PEG-40)	61788-85-0	Aċilal; Alkoħol; Allil; Eter	Viskuż	77,6±5,4	89,1±2,9	Ebda Kat	L	L
1-(4-Klorofenil)-3-(3,4-diklorofenil) urea	101-20-2	Aloġenur eteroċik-liku aromatiku; Aloġenur tal-aril; Derivati tal-urea	S	106,7±5,3	101,9±6,6	Ebda Kat	L	L
2,2′-Metilen-bis-(6-(2H-benżotria-żol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenol)	103597-45-1	Alkan ramifikat b'karbonju kwater-narju; Aromatiku karboċikliku fuż; Eteroċikli saturati fużi; Komposti kwinojdi prekursuri; terz-Butil	S	102,7±13,4	97,7±5,6	Ebda Kat	L	L

Isem Kimiku	CASRN	Grupp Funzjonali Organiku ([1])	Stat Fiżiku	Vijabbiltà tal-VRM1 (%) ([2])	Vijabbiltà tal-VRM2 (%) ([3])	Tbassir tal-VRM	Riduċent tal-MTT	Interf. tal-kulur
Tetrafluworoborat tal-potassju	14075-53-7	Melħ Inorganiku	S	88,6±3,3	92,9±5,1	Ebda Kat	L	L

Abbrevjazzjonijiet:

CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi; GHS tan-NU = Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (1); VRM1 = Metodu ta' Referenza Validat, EpiOcular™ EIT; VRM2 = Metodu ta' Referenza Validat, SkinEthic™ HCE EIT; Interf. tal-kulur = interferenza tal-kulur bil-kejl tal-assorbanza standard (Densità Ottika (OD)) tal-formażan MTT.

([1]) Grupp funzjonali organiku assenjat skont analiżi inkorporata tas-Sett ta' Għodod 3.1 tal-OECD (8).

([2]) Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba b'EpiOcular™ EIT fil-EURL ECVAM/Cosmetics Europe Eye Irritation Validation Study (EIVS) (8).

([3]) Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba bi SkinEthic™ HCE EIT fl-istudju ta' validazzjoni (10)(11).

([4]) Fuq il-bażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TM B.5/OECD TG 405) (2)(14) u bl-użu tal-GHS tan-NU.

([5]) Fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fis-CEFIC CONsortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy (CON4EI) Study.

([6]) Klassifikazzjoni bħala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri 1 minn 3 vs 2 minn 3 annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji biex tiġi ġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju *in vivo* kien jinkludi 3 annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-opaċità korneali f'annimal wieħed irkupraw għal punteġġ ta' żero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkuprax għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' opaċità korneali ta' 1 (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 9.

23. Bħala parti mill-ittestjar tal-profiċjenza, hu rrakkomandat li l-utenti jivverifikaw il-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE (ara l-paragrafi 25, 27 u 30). Dan hu ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal / jekk idumu biex jaslu. Ladarba test ikun ġie stabbilit b'suċċess u tkun inkisbet u ntweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża test b'rutina, hu rakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

PROĊEDURA

24. It-testijiet li bħalissa huma koperti minn dan il-metodu ta' ttestjar huma l-metodi xjentifikament validi ta' EpiOcular™ EIT u ta' SkinEthic™ HCE EIT (9) (12)(13), imsejħa bħala l-Metodu ta' Referenza Validat (VRM1 u VRM2, rispettivament). Il-Proċeduri Operattivi Standard (SOP) għall-metodi ta' ttestjar tal-RhCE huma disponibbli u għandhom jitħaddmu meta jiġu implimentati u jintużaw il-metodi ta' ttestjar f'laboratorju (34)(35). Il-paragrafi li ġejjin u l-Appendiċi 2 jiddeskrivu l-komponenti u l-proċeduri ewlenin tat-testijiet tal-RhCE.

KOMPONENTI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-RHCE

Kundizzjonijiet ġenerali

25. Iċ-ċelloli rilevanti miksuba mill-bniedem għandhom jintużaw biex jiġi rikostitwit it-tessut tridimensjonali tal-epitelju li jixbah il-kornea, li għandu jkun kompost minn ċelloli stratifikati b'mod progressiv iżda mhux kornifikati. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE titħejja f'inserzjonijiet b'membrana sintetika poruża li minnha n-nutrijenti jkunu jistgħu jgħaddu għaċ-ċelloli. Għandu jkun hemm diversi saffi ta' ċelloli epiteljali vijabbli mhux keratinizzati fl-epitelju rikostitwit li jixbah il-kornea. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandu jkollha s-superfiċje epiteljali f'kuntatt dirett mal-arja biex ikun jista' jseħħ esponiment topiku dirett tas-sustanzi kimiċi tat-test b'mod simili għal kif l-epitelju korneali jkun espost *in vivo*. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tifforma barriera funzjonali b'robustezza suffiċjenti biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi ta' referenza ċitotissiċi, eż. Triton X-100 jew dodeċilsulfat tas-sodju (SDS). Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi vvalidata b'determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment meħtieġ biex titnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (ET_{50}) mal-applikazzjoni ta' sustanza ta' referenza f'konċentrazzjoni speċifikata u fissa (eż. 100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100), jew il-konċentrazzjoni li fiha sustanza ta' referenza tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss (eż. trattament ta' 30 minuta b'50 µl SDS) (ara l-paragrafu 30). Il-proprjetajiet ta' kontenitment tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandhom jipprevjenu l-passaġġ tas-sustanza kimika tat-test madwar it-tarf tat-tessut vijabbli, li jista' jwassal għal mudellar ħażin tal-esponiment korneali. Iċ-ċelloli derivati mill-bniedem użati biex tiġi stabbilita l-binja ta' tessuti tal-RhCE għandhom ikunu ħielsa minn kontaminazzjoni b'batterji, b'vajrusis, b'mikoplażma, u b'fungi. L-isterilità tal-binja tat-tessuti għandha tiġi verifikata mill-fornitur għall-assenza ta' kontaminazzjoni b'fungi u b'batterji.

Kundizzjonijiet funzjonali

Vijabbiltà

26. L-assaġġ użat għall-kwantifikazzjoni tal-vijabbiltà tat-tessut hu l-assaġġ MTT (16). Iċ-ċelloli vijabbli tal-mudell ta' tessut tal-RhCE jnaqqsu l-MTT tal-kulurant vitali fi preċipitat tal-blu MTT formażan, li mbagħad jiġi estratt mit-tessut bl-użu tal-isopropanol (jew solvent simili). L-MTT formażan estratt jista' jiġi kwantifikat bl-użu ta' kejl tal-assorbanza

standard (Densità Ottika (OD)) jew bi proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (36). L-OD tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri OD < 0,1. L-utenti tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandhom jiżguraw li kull lott mill-binja tat-tessuti tal-RhCE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv. Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv għall-VRMs jingħataw fit-Tabella 2. Utent tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandu juża l-meded tal-OD tal-kontroll negattiv ipprovduti fit-Tabella 2 bħala l-kriterju ta' aċċettazzjoni għall-kontroll negattiv. Għandu jiġi dokumentat fir-rapport tat-test li t-tessuti ttrattati bis-sustanza tal-kontroll negattiv huma stabbli fil-koltura (jipprovdu kejl tal-vijabbiltà tat-tessuti simili) sakemm idum il-perjodu ta' esponiment tat-test. Il-produttur tat-tessuti għandu jsegwi proċedura simili bħala parti mir-rilaxx tal-lott tat-tessuti tal-kontroll tal-kwalità, iżda f'dan il-każ jistgħu jkunu japplikaw kriterji ta' aċċettazzjoni differenti minn dawk speċifikati fit-Tabella 2. Medda ta' aċċettabbiltà (limitu superjuri u inferjuri) għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-QC) għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE.

Tabella 2

Il-meded ta' aċċettabbiltà għall-valuri tal-OD tal-kontroll negattiv (għall-utenti tat-test)

Test	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (kemm għall-protokolli tal-likwidi kif ukoll tas-solidi)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (kemm għall-protokolli tal-likwidi kif ukoll tas-solidi)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Dan il-limitu ta' aċċettazzjoni jqis il-possibbiltà li jiġi estiż iż-żmien tat-trasport għall-konsenja/tal-ħżin (eż. > erbat ijiem), li ntwera li ma jħallix impatt fuq il-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar (37).

Funzjoni ta' protezzjoni

27. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tkun folta u robusta biżżejjed biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi ta' referenza ċitotossiċi, kif stmati, eż., minn ET_{50} (Triton X-100) jew minn IC_{50} (SDS) (Tabella 3). Il-funzjoni ta' protezzjoni ta' kull lott tal-binja tat-tessuti tal-RhCE użat għandha tintwera mill-iżviluppatur/bejjiegħ tal-binja tat-tessuti tal-RhCE mal-provvista tat-tessuti lill-utent finali (ara l-paragrafu 30).

Morfoloġija

28. L-eżaminazzjoni istoloġika tal-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha turi l-istruttura tal-epitelju li tixbah il-kornea umana (inklużi tal-anqas tliet saffi ta' ċelloli epiteljali vijabbli u superfiċje mhux keratinizzata). Għall-VRMs, il-morfoloġija xierqa ġiet stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur u għalhekk ma għandhiex bżonn terġa' tintwera minn utent ta' metodu ta' ttestjar għal kull lott tat-tessut użat.

Riproduċibbiltà

29. Ir-riżultati tal-kontrolli pożittivi u negattivi tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru r-riproduċibbiltà maż-żmien.

Kontroll tal-kwalità (QC – Quality Control)

30. Il-binja tat-tessuti tal-RhCE għandha tintuża biss jekk l-iżviluppatur/il-fornitur juri li kull lott mill-binja tat-tessuti tal-RhCE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-vijabbiltà (paragrafu 26) u l-funzjoni ta' protezzjoni (paragrafu 27) huma l-aktar rilevanti. Medda ta' aċċettabbiltà (limiti superjuri u inferjuri) għall-funzjonijiet ta' protezzjoni kif imkejla mill-EC_{50} jew mill-IC_{50} (ara l-paragrafi 25 u 26) għandha tiġi stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Il-medda ta' aċċettabbiltà tal-ET_{50} u tal-IC_{50} użata bħala kriterju għar-rilaxx tal-lottijiet tal-QC mill-iżviluppatur/fornitur tal-binjiet tat-tessuti tal-RhCE (użati fil-VRMs) hi mogħtija fit-Tabella 3. Id-*data* li turi konformità mal-kriterji kollha tar-rilaxx tal-produzzjoni għandha tiġi pprovduta mill-iżviluppatur/fornitur tal-binja tat-tessuti tal-RhCE lill-utenti tal-metodu ta' ttestjar biex dawn ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Huma biss riżultati prodotti b'tessuti li jissodisfaw dawn il-kriterji ta' rilaxx tal-produzzjoni kollha li jistgħu jiġu aċċettati għat-tbassir affidabbli ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew għall-ħsara serja lill-għajnejn skont il-GHS tan-NU/is-CLP.

Tabella 3

Kriterju tar-rilaxx tal-lottijiet tal-QC

Test	Limitu inferjuri ta' aċċettabbiltà	Limitu superjuri ta' aċċettabbiltà
EpiOcular™ EIT (OCL-200) – VRM1 (100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE EIT (HCE/S) – VRM2 (trattament ta' 30 b'50 µl SDS)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u tal-Kontroll

31. Tal-anqas għandhom jintużaw żewġ repliki tat-tessuti għal kull sustanza kimika tat-test u għal kull sustanza tal-kontroll f'kull sessjoni. Jintużaw żewġ protokolli differenti tat-trattament, wieħed għal sustanzi kimiċi tat-test likwidi u wieħed għal sustanzi kimiċi tat-test solidi (34)(35). Kemm għall-metodi kif ukoll għall-protokolli, is-superfiċje tal-binja tat-tessuti għandha tiġi mxarrba b'Salina Baferjata tal-Fosfat ta' Dulbecco ħielsa minn kalċju u manjeżju (DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}) qabel l-applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test, biex jiġu imitati l-kundizzjonijiet imxarrba tal-għajn umana. It-trattament tat-tessuti titnieda bl-esponiment għas-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u għas-sustanzi tal-kontroll. Għaż-żewġ protokolli tat-trattament fiż-żewġ VRMs, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti tas-sustanza kimika tat-test jew tas-sustanza tal-kontroll biex tinkwesa b'mod uniformi s-superfiċje epiteljali filwaqt li tiġi evitata doża infinita (ara l-paragrafi 32 u 33) (Appendiċi 2).

32. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jistgħu jiġu pipettati f'temperatura ta' 37 °C jew f'temperaturi inferjuri (bl-użu ta' pipetta bi spostament pożittiv, jekk meħtieġa) jiġu trattati bħala likwidi fil-VRMs, inkella dawn għandhom jiġu trattati bħala solidi (ara l-paragrafu 33). Fil-VRMs, is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jitferrxu b'mod ugwali fuq is-superfiċje tat-tessut (jiġifieri applikazzjoni minima ta' 60 µl/cm^2) (ara l-Appendiċi 2, (33)(34)). Effetti kapillari (effetti ta' tensjo-attivi) li jistgħu jseħħu minħabba l-volumi baxxi applikati għall-inserzjoni (fuq is-superfiċje tat-tessuti) għandhom jiġu evitati sa fejn possibbli biex jiġi garantit id-dożaġġ korrett tat-tessut. Tessuti trattati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test jiġu inkubati għal 30 min f'kundizzjonijiet standard tal-koltura (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥ 95 % RH). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika likwida tat-test u s-sustanzi tal-kontroll għandhom jitneħħew bil-galbu mis-superfiċje tat-tessuti bi tlaħliħ estensiv b'DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} f'temperatura ambjentali. Dan l-istadju ta' tlaħliħ jiġi segwit minn tgħaddis ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'temperatura ambjentali (biex titneħħa kwalunkwe sustanza kimika tat-test assorbita fit-tessut) għal perjodu predefinit ta' żmien li jvarja skont il-VRM użat. Għall-VRM1 biss, inkubazzjoni ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'kundizzjonijiet tal-koltura standard tiġi applikata qabel it-twettiq tal-assaġġ MTT (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)).

33. Is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jistgħux jiġu pipettati f'temperaturi sa 37 °C jiġu trattati bħala solidi fil-VRMs. L-ammont ta' sustanza kimika tat-test applikat għandu jkun suffiċjenti biex tiġi koperta s-superfiċje sħiħa tat-tessut, jiġifieri tal-anqas għandha tintuża applikazzjoni ta' 60 mg/cm^2 (Appendiċi 2). Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. Tessuti trattati b'sustanzi kimiċi solidi tat-test jiġu inkubati għal perjodu ta' żmien predefinit (skont il-VRM użat) f'kundizzjonijiet tal-koltura standard (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika solida tat-test u s-sustanzi tal-kontroll għandhom jitneħħew bil-galbu mis-superfiċje tat-tessuti bi tlaħliħ estensiv b'DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} f'temperatura ambjentali. Dan l-istadju ta' tlaħliħ jiġi segwit minn tgħaddis ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'temperatura ambjentali (biex titneħħa kwalunkwe sustanza kimika tat-test assorbita fit-tessut) għal perjodu predefinit ta' żmien li jvarja skont il-VRM użat, u inkubazzjoni ta' wara l-esponiment f'medium frisk f'kundizzjonijiet tal-koltura standard, qabel ma jitwettaq l-assaġġ tal-MTT (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)).

34. Għandhom ikunu inklużi kontrolli negattivi u pożittivi konkorrenti f'kull sessjoni biex jintwera li l-vijabbiltà (determinata bil-kontroll negattiv) u s-sensittività (determinata bil-kontroll pożittiv) tat-tessuti huma fi ħdan meded ta' aċċettazzjoni definiti fuq il-bażi ta' *data* storika. Il-kontroll negattiv konkorrenti jipprovdi wkoll il-linja bażi (vijabbiltà tat-tessuti ta' 100 %) bie tiġi kkalkolata l-vijabbiltà perċentwali relattiva tat-tessuti trattati bis-sustanza kimika tat-test (%Viability$_{test}$). Is-sustanzi tal-kontroll pożittiv rakkomandata biex tintuża bil-VRMs hi l-aċetat tal-metil nadif (Nru tas-CAS 79-20-9, kummerċjalment disponibbli mingħand eż. Sigma-Aldrich, Kat# 45997; likwidu). Is-sustanzi tal-kontroll negattiv rakkomandati biex jintużaw bil-VRM1 u bil-VRM2 huma H_2O ultrapur u DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}, rispettivament. Dawn kienu s-sustanzi tal-kontroll użati fl-istudji ta' validazzjoni tal-VRMs u huma dawk li għalihom teżisti l-aktar *data* storika. L-użu ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv jew negattiv alternattivi xierqa għandu jkun ġustifikat b'mod xjentifiku u adegwat. Il-kontrolli negattivi u pożittivi għandhom jiġu ttestjati bl-istess protokoll(i) bħal dak/dawk użat(i) għas-sustanzi kimiċi tat-test inklużi fis-sessjoni (jiġifieri għal-likwidi u/jew għas-solidi). Din l-applikazzjoni għandha tiġi segwita mill-esponiment għat-trattament, mit-tlaħliħ, minn tgħaddis ta' wara l-esponiment, u minn inkubazzjoni ta' wara l-esponiment fejn applikabbli, kif deskritti għall-kontrolli mwettqa b'mod konkorrenti għas-sustanzi kimiċi likwidi tat-test (ara l-paragrafu 32) jew għal kontrolli mwettqa b'mod konkorrenti fuq sustanzi kimiċi solidi tat-test (ara l-paragrafu 33), qabel it-twettiq tal-assaġġ tal-MTT (ara l-paragrafu 35) (34)(35). Sett wieħed biss ta' kontrolli negattivi u pożittivi hu biżżejjed għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha tal-istess stat fiżiku (likwidi jew solidi) inklużi fl-istess sessjoni.

Kejl tal-Vijabbiltà tat-Tessuti

35. L-assaġġ tal-MTT hu metodu kwantitattiv standardizzat (16) li għandu jintuża biex ikejjel il-vijabbiltà tat-tessuti taħt dan il-metodu ta' ttestjar. Hu kompatibbli mal-użu f'bini ta' tessut tridimensjonali. L-assaġġ tal-MTT jitwettaq wara l-perjodu ta' inkubazzjoni ta' wara l-esponiment. Fil-VRMs, il-kampjun tal-binja tat-tessuti tal-RhCE jitqiegħed f'soluzzjoni ta' 0,3 ml MTT f'1 mg/ml għal 180±15-il min f'kundizzjonijiet standard tal-koltura. L-MTT tal-kulurant vitali jiġi ridott fi preċipitat tal-formażan MTT blu biċ-ċelloli vijabbli tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Imbagħad, il-prodott tal-formażan MTT blu preċipitat jiġi estratt mit-tessut bl-użu ta' volum xieraq ta' isopropanol (jew ta' solvent simili) (34)(35). It-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test għandhom jiġu estratti mill-quċċata u mill-qiegħ tat-tessuti, filwaqt li t-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi solidi tat-test u b'likwidi kkuluriti għandhom jiġu estratti mill-qiegħ tat-tessut biss (biex tiġi minimizzata kwalunkwe kontaminazzjoni potenzjali tas-soluzzjoni ta' estrazzjoni tal-isopropanol bi kwalunkwe sustanza kimika tat-test li tista' tkun għadha fuq it-tessut). It-tessuti ttestjati b'sustanzi kimiċi likwidi tat-test li ma jinqalgħux minnufih jistgħu jiġu estratti wkoll mill-qiegħ tat-tessut biss. Is-sustanzi tal-kontroll negattiv u pożittiv ittestjati b'mod konkorrenti għandhom jiġu trattati b'mod simili għas-sustanza kimika tat-test. Il-formażan MTT estratt jista' jiġi kwantifikat jew b'kejl tal-assorbanza standard (OD) f'570 nm bl-użu ta' filtru band pass ta' massimu ta' ±30 nm jew bl-użu ta' proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-paragrafu 42) (11)(36).

36. Il-proprjetajiet ottiċi tas-sustanza kimika tat-test jew l-azzjoni kimika ta' din fuq l-MTT jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-formażan MTT u dan jista' jwassal għal stima falza tal-vijabbiltà tat-tessut. Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-formażan MTT, jew bi tnaqqis dirett tal-MTT fi blu formażan MTT u/jew b'interferenza tal-kulur jekk is-sustanza kimika tat-test tassorbi, b'mod naturali jew minħabba l-proċeduri ta' trattament, fl-istess medda tal-OD bħall-formażan MTT (jiġifieri madwar 570 nm). Il-kontrolli minn qabel għandhom isiru qabel l-ittestjar biex ikunu jistgħu jiġu identifikati r-riduċenti potenzjali diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-kulur u għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex tiġi identifikata u kkoreġuta interferenza potenzjali mit-tali sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafi 37-41). Dan hu partikolarment importanti meta sustanza kimika speċifika tat-test ma titneħħiex għalkollox mill-binja tat-tessuti tal-RhCE bit-tlaħliħ jew meta din tippenetra l-epitelju li jixbah il-kornea u għalhekk tkun preżenti fil-binjiet tat-tessuti tal-RhCE meta jitwettaq l-assaġġ tal-MTT. Għal sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħall-formażan MTT (b'mod naturali jew wara t-trattament), li mhumiex kompatibbli mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT minħabba interferenza qawwija wisq, jiġifieri assorbiment qawwi f'570±30 nm, tista' tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT (ara l-paragrafi 41 u 42) (11)(36). Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu individwati u kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti koloranti hi disponibbli fl-SOPs tal-VRMs (34)(35). Flowcharts illustrattivi li jipprovdu gwida dwar kif tidentifika u timmaniġġja riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi interferenti tal-kulur għall-VRM1 u għall-VRM2 huma pprovduti wkoll fl-Appendiċijiet III u IV rispettivament.

37. Biex tiġi identifikata interferenza potenzjali mis-sustanzi kimiċi tat-test li jassorbu d-dawl fl-istess medda bħall-formażan MTT (b'mod naturali jew wara t-trattament) u tittieħed deċiżjoni dwar il-ħtieġa ta' kontrolli addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiżdied mal-ilma u/jew mal-isopropanol u tiġi inkubata għal ħin xieraq f'temperatura ambjentali (ara l-Appendiċi 2, (34)(35)). Jekk is-sustanza kimika tat-test fl-ilma u/jew fl-isopropanol tassorbi biżżejjed dawl fil-medda ta' 570±20 nm għall-VRM1 (ara l-Appendiċi 3), jew jekk tinkiseb soluzzjoni kkulurita meta s-sustanza kimika tat-test titħallat mal-ilma għall-VRM 2 (ara l-Appendiċi 4), is-sustanza kimika tat-test tiġi preżunta li tinterferixxi mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT u għandhom isiru kontrolli ulterjuri tal-koloranti jew, inkella, għandha tintuża proċedura ta' spettrofotometrija tal-HPLC/UPLC f'liema każ dawn il-kontrolli ma jkunux meħtieġa (ara l-paragrafi 41 u 42 u l-Appendiċijiet III u IV)(34)(35). Meta jsir il-kejl tal-assorbanza standard (OD), kull sustanza kimika tat-test interferenti għandha tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut vijabbli, li ssirilhom il-proċedura sħiħa ta' ttestjar iżda jiġu inkubati b'medium minflok b'soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT biex jiġġeneraw kontroll tal-kulur mhux speċifiku f'tessuti ħajjin (NSC_{living}) (34)(35). Il-kontroll tal-NSC_{living} irid jitwettaq fl-istess ħin bħall-ittestjar tas-sustanza kimika tat-test ikkulurita u, f'każ ta' ttestjar multiplu, irid jitwettaq kontroll indipendenti tal-NSC_{living} li għandu jsir b'kull test imwettaq (f'kull sessjoni) minħabba l-varjabbiltà bijoloġika inerenti tat-tessuti ħajjin. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati bis-soluzzjoni MTT ($\%Viability_{test}$) <u>nieqes</u> il-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut ($\%NSC_{living}$), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [$\%Viability_{test}$] - [$\%NSC_{living}$].

38. Biex jiġu identifikati r-ridutturi diretti tal-MTT, kull sustanza kimika tat-test għandha tiżdied ma' soluzzjoni MTT preparata ġdida. Jiżdied ammont xieraq tas-sustanza kimika tat-test ma' soluzzjoni tal-MTT u t-taħlita tiġi inkubata għal madwar tliet sigħat f'kundizzjonijiet standard tal-koltura (ara l-Appendiċijiet III u IV)(34)(35). Jekk it-taħlita ta' MTT li fiha s-sustanza kimika tat-test (jew is-sospensjoni għal sustanzi kimiċi tat-test insolubbli) issir blu/vjola, is-sustanza kimika tat-test tkun preżunta li tnaqqas b'mod dirett l-MTT u għandha ssir verifika funzjonali oħra fuq il-binjiet tat-tessuti tal-RhCE mhux vijabbli, indipendentement mill-użu tal-kejl tal-assorbanza standard (OD) jew ta' proċedura tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC. Din il-verifika funzjonali addizzjonali tħaddem tessuti maqtula li jkollhom biss attività metabolika residwa iżda jassorbu u jżommu s-sustanza kimika tat-test b'mod simili bħal tessuti vijabbli. It-tessuti maqtula tal-VRM1 jitħejjew b'esponiment għal temperatura baxxa ("qtil bil-friża"). It-tessuti maqtula tal-VRM2 jitħejjew b'inkubazzjoni fit-tul (eż. tal-anqas 24±1 siegħa) f'ilma segwita minn ħżin f'temperatura baxxa ("maqtula bl-ilma"). Kull sustanza kimika tat-test li tnaqqas l-MTT tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessut maqtula li ssirilhom il-proċedura sħiħa ta' ttestjar biex jiġi ġenerat kontroll ta' tnaqqis mhux speċifiku tal-MTT (NSMTT) (34)(35). Kontroll tal-NSMTT wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għar-riduċent tal-MTT ($\%Viability_{test}$) <u>nieqes</u> it-tnaqqis tal-MTT mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għall-istess riduttur tal-MTT, ikkalkolat b'rabta mas-sessjoni ta' kontroll negattiv b'mod konkorrenti għat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSMTT), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [$\%Viability_{test}$] - [%NSMTT].

39. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jiġu identifikati bħala li jipproduċu kemm interferenza tal-kulur (ara l-paragrafu 37) kif ukoll tnaqqis dirett tal-MTT (ara l-paragrafu 38) se jkunu jeħtieġu wkoll it-tielet sett ta' kontrolli meta jitwettaq il-kejl tal-assorbanza standard (OD), minbarra l-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC_{living} deskritti fil-paragrafi ta' qabel. Normalment dan ikun il-każ b'sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti skuri li jassorbu dawl fil-medda ta' 570±30 nm (eż. blu, vjola, suwed) minħabba li l-kulur intrinsiku tagħhom ixekkel il-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom li jnaqqsu b'mod dirett l-MTT kif deskritt fil-paragrafu 38. Dan iġieħel l-użu ta' kontrolli tal-NSMTT, b'mod predefinit, flimkien mal-kontrolli tal-NSC_{living}. Is-sustanzi kimiċi tat-test li għalihom jitwettqu kemm il-kontrolli tal-NSMTT u tal-NSC_{living} jistgħu jiġu assorbiti u jinżammu kemm minn tessuti ħajjin kif ukoll minn dawk maqtula. Għalhekk, f'dan il-każ, il-kontroll tal-NSMTT jaf ma jikkoreġix biss għat-tnaqqis potenzjali dirett tal-MTT mis-sustanza kimika tat-test,iżda

anki għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mill-assorbiment u miż-żamma tas-sustanza kimika tat-test mit-tessuti maqtula. Dan jista' jwassal għal korrezzjoni doppja għall-interferenza tal-kulur peress li l-kontroll tal-NSC_{living} diġà jikkoreġi għall-interferenza tal-kulur li tirriżulta mill-assorbiment u miż-żamma tas-sustanza kimika tat-test mit-tessuti ħajjin. Biex tiġi evitata korrezzjoni doppja possibbli għall-interferenza tal-kulur, irid isir it-tielet kontroll għal kulur mhux speċifiku f'tessuti maqtula (NSC_{killed}) (ara l-Appendiċijiet III u IV)(34)(35). F'dan il-kontroll addizzjonali, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti maqtula, li ssirilhom il-proċedura tal-ittestjar sħiħa iżda jiġu inkubati b'medium minflok is-soluzzjoni tal-MTT matul l-istadju tal-inkubazzjoni tal-MTT. Kontroll tal-NSC_{killed} wieħed hu biżżejjed għal kull sustanza kimika tat-test indipendentement min-numru ta' testijiet/sessjonijiet indipendenti mwettqa, iżda għandu jsir fl-istess ħin mal-kontroll tal-NSMTT u bl-istess lott ta' tessuti. Il-vijabbiltà vera tat-tessuti tiġi kkalkolata bħala: il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test (%$Viability_{test}$) nieqes %NSMTT nieqes %NSC_{living}biż-żieda tal-kulur mhux speċifiku perċentwali miksub bit-tessuti maqtula esposti għas-sustanza kimika tat-test interferenti u inkubati b'medium mingħajr MTT, ikkalkolati b'rabta mas-sessjoni tal-kontroll negattiv imwettqa fl-istess ħin bħat-test li jkun qed jiġi kkoreġut (%NSC_{killed}), jiġifieri l-Vijabbiltà vera tat-tessut = [%$Viability_{test}$] - [%NSMTT] - [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

40. Hu importanti li jiġi nnotat li r-riduzzjoni mhux speċifika tal-MTT u l-interferenzi mhux speċifiċi tal-kulur jistgħu jiżdiedu meta l-OD (meta jsiru kejlijiet tal-assorbanza standard) tal-estratt tat-tessuti ogħla mill-medda ta' linearità tal-ispettrofotometru u li r-riduzzjoni mhux speċifika tal-MTT tista' wkoll iżżid l-erja tal-quċċata tal-formażan MTT (meta jsiru kejlijiet tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC) tal-estratt tat-tessut f'livell ogħla mill-medda ta' linearità tal-ispettrofotometru. Fuq din il-bażi, hu importanti li kull laboratorju jiddetermina l-medda tal-linearità tal-OD/tal-erja tal-quċċata tal-ispettrofotometru tiegħu, eż., bil-formażan tal-MTT (CAS # 57360-69-7), disponibbli kummerċjalment mingħand, eż. Sigma-Aldrich (Kat# M2003), qabel il-bidu tal-ittestjar tas-sustanzi kimiċi tat-test għal finijiet regolatorji.

41. Il-kejl tal-assorbanza standard (OD) bl-użu ta' spettrofotometru hu xieraq biex jiġu vvalutati r-riduċenti diretti tal-MTT u s-sustanzi kimiċi tat-test interferenti tal-kulur, meta l-interferenza osservata mal-kejl tal-formażan MTT ma tkunx qawwija wisq (jiġifieri l-ODs tal-estratti tat-tessut miksuba bis-sustanza kimika tat-test mingħajr ebda korrezzjoni għal riduzzjoni diretta tal-MTT u/jew għal interferenza tal-kulur ikunu fi ħdan il-medda lineari tal-ispettrofotometru). Minkejja dan, ir-riżultati għas-sustanzi kimiċi tat-test li jipproduċu %NSMTT u/jew %NSC_{living} ≥ 60 % (VRM1, u VRM2 għall-protokoll tal-likwidi) jew 50 % (VRM2 għall-protokoll tas-solidi) tal-kontroll negattiv għandhom jittieħdu b'attenzjoni peress li dan hu l-limitu stabbilit użat fil-VRMs biex jiġu distinti s-sustanzi kimiċi klassifikati minn dawk mhux klassifikati (ara l-paragrafu 44). Madankollu, l-assorbanza standard (OD) ma tistax titkejjel meta l-interferenza mal-kejl tal-formażan MTT tkun qawwija wisq (jiġifieri twassal għal ODs mhux ikkoreġuti tal-estratti tat-tessut tat-test li jaqgħu barra mill-medda lineari tal-ispettrofotometru). Sustanzi kimiċi tat-test kuluriti jew sustanzi kimiċi tat-test li jieħdu l-kulur f'kuntatt mal-ilma jew mal-isopropanol li jinterferixxu b'wisq qawwa mal-kejl tal-assorbanza standard (OD) tal-formażan MTT xorta waħda jistgħu jiġu vvalutati bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC (ara l-Appendiċijiet III u IV). Dan għaliex is-sistema tal-HPLC/UPLC tippermetti s-separazzjoni tal-formażan MTT mis-sustanza kimika qabel il-kwantifikazzjoni tiegħu (36). Għal din ir-raġuni, il-kontrolli tal-NSC_{living} jew tal-NSC_{killed} qatt ma jkunu meħtieġa meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, indipendentement mis-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Il-kontrolli tal-NSMTT xorta waħda għandhom jintużaw jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tnaqqas l-MTT b'mod dirett (wara l-proċedura deskritta fil-paragrafu 38). Il-kontrolli tal-NSMTT għandhom jintużaw ukoll bis-sustanzi kimiċi tat-test li jkollhom (intrinsiku jew li jidher meta jkunu fl-ilma) kulur li jimpedixxi l-valutazzjoni tal-kapaċità tagħhom ta' tnaqqis dirett tal-MTT kif deskritta fil-paragrafu 38. Meta tintuża l-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC biex jitkejjel il-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali tiġi kkalkolata bħala l-ogħla erja perċentwali tal-formażan MTT miksuba b'tessuti ħajjin esposti għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-ogħla erja tal-formażan MTT miksuba bil-kontroll negattiv konkorrenti. Għal sustanzi kimiċi tat-test li kapaċi jnaqqsu l-MTT b'mod dirett, il-vijabbiltà vera tat-tessut tiġi kkalkolata bħala: %$Viability_{test}$nieqes %NSMTT, kif deskritta fl-aħħar sentenza tal-paragrafu 38. Finalment, ta' min jinnota li r-riduċenti diretti tal-MTT jew riduċenti diretti tal-MT li jkunu interferenti tal-kulur ukoll, li jinżammu fit-tessuti wara t-trattament u jnaqqsu l-MTT b'tant saħħa li jwasslu għal ODs (bl-użu ta' kejl standard tal-ODs) jew l-ogħla erjas (bl-użu tal-ispettrofotometrija tal-UPLC/HPLC) tal-estratti tat-tessuti ttestjati li jaqgħu barra mill-medda tal-linearità tal-ispettrofotometru ma jistgħux jiġu vvalutati b'metodi ta' ttestjar tal-RhCE, għalkemm dawn ikunu mistennija jseħħu f'sitwazzjonijiet rari ħafna biss.

42. L-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC tista' tintuża bit-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi tat-test (ikkuluriti, mhux ikkuluriti, riduċenti tal-MTT u mhux riduċenti tal-MTT) għall-kejl tal-formażan MTT (11)(36). Minħabba d-diversità tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC, mhuwiex fattibbli li kull utent jistabbilixxi l-istess eżatt kundizzjonijiet tas-sistema. B'hekk, il-kwalifikazzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC għandha tintwera qabel l-użu tagħha għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT mill-estratti tat-tessuti bl-issodisfar tal-kriterji ta' aċċettazzjoni għal sett ta' parametri standard ta' kwalifikazzjoni fuq il-bażi ta' dawk deskritti fil-gwida tal-Food and Drug Administration tal-Istati Uniti għall-industrija fuq il-validazzjoni tal-metodi bijoanalitiċi (36) (38). Dawn il-parametri importanti u l-kriterji ta' aċċettazzjoni tagħhom jintwerew fl-Appendiċi 5. Ladarba jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni definiti fl-Appendiċi 5, is-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC titqies kwalifikata u lesta biex tkejjel il-formażan MTT fil-kundizzjonijiet sperimentali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Kriterji ta' Aċċettazzjoni

43. Għal kull sessjoni li tuża l-lottijiet tat-tessut tal-RhCE li ssodisfaw il-kontroll tal-kwalità (ara l-paragrafu 30), tessuti relatati mas-sustanza tal-kontroll negattiv għandhom jesibixxu OD li tirrifletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-konsenja, l-istadji tar-riċevuta u l-proċessi tal-protokolli kollha u ma għandhomx ikunu barra mil-limiti stabbiliti storikament deskritti fit-Tabella 2 (ara l-paragrafu 26). B'mod simili, tessuti trattati bis-sustanzi tal-kontroll pożittiv, jiġifieri l-aċetat tal-metil, għandhom juru vijabbiltà medja tat-tessut ta' < 50 % meta mqabbla mal-kontroll negattiv fil-FRM1 bi protokolli tal-likwidi jew tas-solidi, u ta' ≤ 30 % (protokoll tal-likwidi) jew ta' ≤ 20 % (protokoll tas-solidi) meta mqabbla mal-kontroll negattiv fil-VRM2, u b'hekk jirriflettu l-ħila tat-tessuti li jwieġbu għal sustanza kimika tat-test irritanti fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (34)(35). Il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll għandha taqa' fi ħdan il-limiti aċċettati (jiġifieri d-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 % jew id-devjazzjoni standard (SD) bejn tliet repliki tat-tessuti ma għandhiex taqbeż it-18 %). Jekk il-kontroll negattiv jew il-kontroll pożittiv inkluż f'sessjoni jkun barra mill-meded aċċettati, is-sessjoni titqies "mhix kwalifikata" u għandha tiġi ripetuta. Jekk il-varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti ta' sustanza kimika tat-test tkun barra mill-medda aċċettata, it-test irid jitqies "mhux kwalifikat" u s-sustanza kimika tat-test għandha terġa' tiġi ttestjata.

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir

44. Il-valuri tal-OD/il-quċċata tal-erjas miksuba bl-estratti tat-tessut tar-repliki għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jintużaw biex tiġi kkalkolata l-vijabbiltà medja perċentwali tat-tessut (medja bejn ir-repliki tat-tessut) normalizzata għall-kontroll negattiv, li hi stabbilita għal 100 %. Il-valur ta' limitu perċentwali għall-vijabbiltà tat-tessut għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test li ma jeħtiġux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew għal ħsara serja lill-għajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP) hu mogħti fit-Tabella 4. B'hekk, ir-riżultati għandhom jiġu interpretati kif ġej:

— Is-sustanza kimika tat-test tiġi identifikata bħala li ma teħtieġx klassifikazzjoni u tikkettar (Ebda Kategorija) tal-GHS tan-NU/tas-CLP jekk il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment tkun aktar (>) mill-valur ta' limitu perċentwali stabbilit tal-vijabbiltà tat-tessut, kif muri fit-Tabella 4. F'dan il-każ, ma jkun meħtieġ ebda ttestjar ulterjuri f'metodi ta' ttestjar oħra.

— Jekk il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment tkun anqas minn jew daqs (≤) il-valur ta' limitu perċentwali stabbilit tal-vijabbiltà tat-tessut, ma jkun jista' jsir ebda tbassir, kif muri fit-Tabella 4. F'dan il-każ, ittestjar ulterjuri b'metodi ta' ttestjar oħra jkun meħtieġ minħabba li l-metodi ta' ttestjar tal-RhCE juru ċertu numru ta' riżultati tal-pożittivi foloz (ara l-paragrafi 14-15) u ma jistgħux jiddistingwu bejn il-Kategoriji 1 u 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP (ara l-paragrafu 17).

Tabella 4

Mudelli tat-Tbassir skont il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU u tas-CLP

VRM	Ebda Kategorija	Ma tista' ssir ebda previżjoni
VRM 1 - EpiOcular™ EIT (għaż-żewġ protokolli)	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 60 %	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 60 %
VRM 2 - SkinEthic™ HCE EIT (għall-protokoll tal-likwidi)	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 60 %	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 60 %
VRM2 - SkinEthic™ HCE EIT (għall-protokoll tas-solidi)	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' > 50 %	Vijabbiltà medja tat-tessut ta' ≤ 50 %

45. Test wieħed magħmul minn tal-anqas żewġ repliki tat-tessuti għandu jkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta r-riżultat ikun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl irreplikat mhux konkordanti u/jew il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessut ugwali għal 60±5 % (VRM1, u VRM2 għall-protokoll tal-likwidi) jew 50±5 % (VRM2 għall-protokoll tas-solidi), għandu jiġi kkunsidrat it-tieni test, kif ukoll it-tielet wieħed f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ testijiet.

46. Valuri ta' limitu perċentwali differenti tal-vijabbiltà tat-tessut li jiddistingwu s-sustanzi kimiċi tat-test klassifikati minn dawk mhux klassifikati jistgħu jiġu kkunsidrati għal tipi speċifiċi ta' taħlitiet, fejn xieraq u ġustifikabbli, biex tiżdied il-prestazzjoni ġenerali tal-metodu ta' ttestjar għal dawk it-tipi ta' taħlitiet (ara l-paragrafu 14). Is-sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu siewja għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' ħsara serja lill-għajnejn/ta' irritazzjoni tal-għajnejn ta' sustanzi kimiċi tat-test jew ta' klassi ta' prodotti mhux magħrufa, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv ta' tossiċità okulari ta' sustanza kimika klassifikata fi ħdan medda speċifika ta' risponsi pożittivi.

DATA U RAPPORTAR

Data

47. Id-*data* minn tessuti ta' repliki individwali f'sessjoni (eż. valuri tal-OD/erjas tal-quċċata tal-formażan MTT u d-*data* tal-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali kkalkolata għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli, u t-tbassir finali tal-metodu ta' ttestjar tal-RhCE) għandha tiġi rapportata f'forma tabulari għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża d-*data* minn testijiet ripetuti, kif xieraq. Barra minn hekk, għandha tiġi rapportata l-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessut u d-differenza fil-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti (jekk n=2 tessuti replikati) għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll individwali. Kwalunkwe interferenza osservata ta' sustanza kimika tat-test mal-kejl tal-formażan MTT permezz tat-tnaqqis dirett tal-MTT u/jew tal-interferenza kkulurita għandha tiġi rapportata għal kull sustanza kimika ttestjata.

Rapport tat-Test

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

Sustanza Kimika tat-Test

Sustanza monokostitwenti

— L-identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-reġistru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;

— L-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, il-LogP, il-piż molekulari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, *eċċ.*;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż. tishin, thin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita

— Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli skont, pereżempju, l-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn disponibbli;

— L-istat fiżiku u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

Sustanzi tal-Kontroll Pożittiv u Negattiv

— L-identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i tar-reġistru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħra;

— L-istat fiżiku, il-volatilità, il-piż molekolari, il-klassi kimika, u proprjetajiet fiżikokimiċi addizzjonali rilevanti għat-twettiq tal-istudju, sa fejn disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-użu ta' kontroll negattiv differenti li mhuwiex H20 ultrapur jew DPBS ħielsa minn Ca 2+/Mg2+, jekk applikabbli;

— Ġustifikazzjoni għall-użu ta' kontroll pożittiv differenti li mhuwiex aċetat tal-metil nadif, jekk applikabbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni.

Informazzjoni dwar l-Isponser u l-Faċilità tat-Test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju.

— *Il-Binja tat-Tessuti tal-RhCE u l-Protokoll Użati (filwaqt li tiġi pprovduta r-raġuni għall-għażliet, jekk applikabbli)*

Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar

— Il-binja tat-tessuti tal-RhCE użata, inkluż in-numru tal-lott;

— It-tul ta' mewġa u l-band pass (jekk applikabbli) użati għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT, u l-medda tal-linearità tal-apparat tal-kejl (eż. spettrofotometru);

— Deskrizzjoni tal-metodu użat għall-kwantifikazzjoni tal-formażan MTT;

— Deskrizzjoni tas-sistema tal-ispettrofotometrija tal-HPLC/UPLC użata, jekk applikabbli;

— Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-binja tat-tessuti tal-RhCE speċifika użata inkluża l-prestazzjoni tagħha. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:

i) Il-kontroll tal-kwalità tal-vijabbiltà (fornitur)

ii) Il-vijabbiltà fil-kundizzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar (utent);

iii) Il-kontroll tal-kwalità tal-funzjoni ta' protezzjoni;

iv) Il-morfoloġija, jekk disponibbli;

v) Ir-riproduċibbiltà u l-kapaċità ta' tbassir;

vi) Kontrolli oħra tal-kwalità (QC) tal-binja tat-tessuti tal-RhCE, jekk disponibbli;

— Referenza għad-*data* storika tal-binja tat-tessuti tal-RhCE. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal: Aċċettabbiltà tad-*data* dwar il-QC b'referenza għad-*data* storika tal-lott;

— Dikjarazzjoni li l-faċilità ta' ttestjar uriet proficjenza fl-użu tal-metodu ta' ttestjar qabel l-użu ta' rutina bl-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ta' proficjenza;

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tas-Sessjoni u tat-Test

— Il-medji tal-kontrolli pożittivi u negattivi u l-meded tal-aċċettazzjoni fuq il-bażi tad-*data* storika;

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għall-kontrolli pożittivi u negattivi;

— Il-varjabbiltà aċċettabbli bejn ir-repliki tat-tessuti għas-sustanza kimika tat-test;

Proċedura tat-Test

— Id-ettalji tal-proċedura tat-test użata,

— Id-ożi tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll użati;

— Id-urata u temperatura tal-perjodi ta' esponiment, tat-tgħaddis ta' wara l-esponiment u tal-inkubazzjoni ta' wara l-esponiment (fejn applikabbli);

— Id-eskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika fil-proċedura tat-test;

— L-indikazzjoni tal-kontrolli użati għal riduċenti diretti tal-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur, jekk applikabbli;

— In-numru ta' repliki tat-tessuti użati għal kull sustanza kimika tat-test u kontroll (kontroll pożittiv, kontroll negattiv, NSMTT, NSCliving u NSCkilled, jekk applikabbli);

Riżultati

— Tabultazzjoni tad-*data* minn sustanzi kimiċi tat-test u minn sustanzi tal-kontroll individwali, għal kull sessjoni (inklużi esperimenti ripetuti fejn applikabbli) u kull kejl tar-repliki, inklużi l-valur tal-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, il-vijabbiltà tat-tessuti perċentwali, il-vijabbiltà perċentwali medja tat-tessuti, id-Differenza bejn ir-repliki tat-tessuti jew l-SD, u t-tbassir finali;

— Jekk applikabbli, ir-riżultati tal-kontrolli użati għar-riduċenti diretti tal-MTT u/jew is-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti inklużi l-valur tal-OD jew l-ogħla erja tal-formażan MTT, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, id-Differenza bejn ir-repliki tat-tessuti jew l-SD, il-vijabbiltà perċentwali korretta finali tat-tessut, u t-tbassir finali;

— Ir-riżultati miksuba bis-sustanza/i kimika/kimiċi tat-test u bis-sustanzi tal-kontroll b'rabta mas-sessjoni definita u mal-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati, eż. il-kolorazzjoni tat-tessuti minn sustanza kimika tat-test ikkulurita;

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) NU (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/Korrużjoni Akuta tal-Għajnejn.

(3) Il-Kapitolu B.47 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Opaċità u l-Permeabbiltà tal-Kornea fil-Bovini għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Ħsara Serja lill-Għajnejn.

(4) Il-Kapitolu B.48 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Għajnejn tat-Tiġieġ Iżolati għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni.

(5) Il-Kapitolu B.61 ta' dan l-Anness, Il-Metodu ta' Ttestjar tat-Tnixxija ta' Fluworexxina għall-Identifikazzjoni ta' Korrużivi Okulari u ta' Irritanti Severi.

(6) Il-Kapitolu B.68 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar *In Vitro* b'Esponiment għal Ħin Qasir għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Ħsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jeħtiġux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Ħsara Serja lill-Għajnejn.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Disponibbli fuq: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE u studju relatat ta' Cosmetics Europe dwar HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. Opinjoni tal-ESAC Nru 2014-03 tas-17 ta' Novembru 2014; EUR 28173 EN; doi: 10.2787/043697 Tħassir Disponibbli fuq: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). Opinjoni tal-ESAC Nru 2016-02 tal-24 ta' Ġunju 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390 Tħassir Disponibbli fuq: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Il-Manuskritt Għadu Qed Jitħejja).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. Fi: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. F'*Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.u Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922-936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115-130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610-2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41-54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (5 ta' Marzu 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponibbli fuq: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (20 ta' Lulju 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponibbli fuq: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mejju 2001. Disponibbli fuq: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Parigi.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' "rilevanza". Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (18).

Sustanza kimika ta' referenza: Sustanza kimika użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli għall-identifikazzjoni u għall-karatterizzazzjoni tagħhom; (ii) similarità strutturali, funzjonali u/jew tal-klassi tas-sustanza kimika jew tal-prodott għas-sustanza/i kimika/kimiċi li tkun/ikunu qed tiġi/jiġu ttestjata/i; (iii) il-karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) *data* ta' appoġġ dwar effetti magħrufa; u (v) il-potenza magħrufa fl-iskala tar-rispons mixtieq.

Approċċ Minn Isfel għal Fuq: Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika tat-test suspettata li ma teħtieġx klassifikazzjoni u tikkettar għall-irritazzjoni tal-għajnejn jew ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux klassifikazzjoni u tikkettar (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

Konkordanza: Ara "Akkuratezza".

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-għajn li tiksi l-iris u l-pupilla u thalli d-dawl jgħaddi għal ġol-parti interna tal-għajn.

CV: Koeffiċjent ta' Varjazzjoni.

Dev: Devjazzjoni.

EIT: Test tal-Irritazzjoni tal-Għajnejn.

EURL ECVAM: Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Annimali.

Irritazzjoni tal-għajnejn: Il-produzzjoni ta' tibdiliet fl-għajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ ta' wara tal-għajn, li jkunu kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti reversibbli fuq l-għajnejn" u mal-Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP".

ET_{50}: Ħin tal-esponiment meħtieġ biex il-vijabbiltà tat-tessuti titnaqqas b'50 % mal-applikazzjoni ta' sustanza kimika ta' riferiment f'konċentrazzjoni speċifikata fissa.

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon ta' sustanzi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' pożittivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi minn metodu ta' ttestjar. Dan hu wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

HCE: Epitelju Korneali Uman ta' SkinEthic™.

HPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja.

IC_{50}: Konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika ta' riferiment tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % wara ħin ta' esponiment fis (eż. trattament ta' 30 minuta bl-SDS).

Doża infinita: Ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-binja tat-tessuti tal-RhCE lil hinn mill-ammont meħtieġ biex tinkesa b'mod sħiħ u uniformi s-superfiċje tal-epiteljali.

Effetti irreversibbli fuq l-għajnejn: Ara "Ħsara serja lill-għajnejn".

LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni.

LogP: Logaritmu tal-koeffiċjent ta' partizzjoni tal-ottanol/ilma

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bit-tħallit ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

MTT: Bromur tat-3-(4,5-Dimetiltjażol-2-il)-2,5-difeniltetrażolju; Bromur tat-tetrażolju tal-blu tjażolil.

Kontroll negattiv: Kampjun li jkun fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li ma tinduċix rispons pożittiv fis-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn u jintuża biex tiġi determinata l-vijabbiltà tat-tessut ta' 100 %.

Mhux ikklassifikati: Sustanzi kimiċi li mhumiex klassifikati għall-Irritazzjoni tal-għajnejn (Kategorija 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP, Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU) jew Ħsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP). Interkambjabbli ma' "Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/tas-CLP".

NSC_{killed}: Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti maqtula.

NSC_{living}: Kulur Mhux Speċifiku f'tessuti ħajjin.

NSMTT: Tnaqqis fl-MTT Mhux Speċifiku.

OD: Densità Ottika.

Standards tal-prestazzjoni: Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat li tqies xjentifikament validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi: (i) il-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (18).

Kontroll pożittiv: Kampjun li jkun fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tinduċi rispons pożittiv fis-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (18).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (18).

Test ta' sostituzzjoni: Test li hu mfassal biex jieħu post test li hu f'użu ta' rutina u aċċettat għall-identifikazzjoni tal-perikli u/jew għall-valutazzjoni tar-riskji, u li ġie determinat li jipprovdi protezzjoni ekwivalenti jew imtejba tas-saħħa tal-bniedem jew tal-annimali jew tal-ambjent, skont kif ikun applikabbli, meta mqabbel mat-test aċċettat, għas-sitwazzjonijiet u għas-sustanzi kimiċi ta' ttestjar possibbli kollha (18).

Riproduċibbiltà: Il-qbil bejn ir-riżultati miksub mill-ittestjar ripetut tal-istess sustanza kimika tat-test bl-użu tal-istess protokoll tat-test (Ara "Affidabbiltà") (18).

Effetti reversibbli fuq l-għajnejn: Ara "Irritazzjoni tal-għajnejn".

RhCE: Epitelju bħall-Kornea Umana Rikostitwit.

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll pożittiv.

SD: Devjazzjoni Standard.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (18).

Ħsara serja lill-għajnejn: Il-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-għajnejn, jew ta' tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunux riversibbli għalkollox fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti irreversibbli fuq l-għajn" u mal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP".

Proċeduri Operattivi Standard (SOP): Proċeduri formali miktuba li jiddeskrivu fid-dettall kif għandhom jitwettqu operazzjonijiet speċifiċi ta' rutina, u speċifiċi għat-testijiet, tal-laboratorju. Dawn huma meħtieġa mill-GLP.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi tat-test negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (18).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Test: Sustanza kimika tat-test waħda testjata b'mod konkorrenti f'minimu ta' żewġ repliki ta' tessuti kif definiti fl-SOP korrispondenti.

Vijabbiltà tat-tessuti: Il-parametru li jkejjel l-attività sħiħa tal-popolazzjoni ċellulari f'tessut rikostitwit bħala l-ħila tagħha li tnaqqas l-MTT tal-kolorant vitali, li, skont il-punt ta' tmiem imkejjel u d-disinn tat-test użat, jikkorrispondi għall-għadd totali u/jew għall-vitalità taċ-ċelloli ħajjin.

Approċċ Minn Fuq Għal Isfel: Approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika suspettata li tikkawża ħsara serja lill-għajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-għajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħra (eżitu negattiv).

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali: Strateġija ta' ttestjar sekwenzjali, li tuża l-metodi ta' ttestjar f'sekwenza. L-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi rieżaminata, f'kull saff, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell biex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss fl-istrateġija. Jekk il-potenzjal/potenza ta' periklu ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti f'saff partikolari, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor (18).

ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (1).

Kategorija 1 tal-GHS tan-NU u tas-CLP: Ara "Ħsara serja lill-għajnejn".

Kategorija 2 tal-GHS tan-NU u tas-CLP: Ara "Irritazzjoni tal-għajnejn".

Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU u tas-CLP: Sustanzi kimiċi li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni bħala tal-Kategorija 1 jew 2 tal-GHS tan-NU/tas-CLP (jew tal-Kategorija 2A jew 2B tal-GHS tan-NU). Interkambjabbli ma' "Mhux Klassifikati".

UPLC: Kromatografija Likwida ta' Prestazzjoni Għolja Ħafna.

UVCB: sustanzi b'kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Metodu ta' ttestjar validu: Metodu ta' ttestjar meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Metodu ta' ttestjar qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (18).

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex jiġu determinati r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabli għall-għan propost (18).

VRM: Metodu ta' Riferiment Validat.

VRM1: EpiOcular™ EIT jissejjaħ il-Metodu ta' Riferiment Validat 1.

VRM2: SkinEthic™ HCE EIT jissejjaħ il-Metodu ta' Riferiment Validat 2.

Piż tal-evidenza: Il-proċess ta' kunsiderazzjoni tal-aspetti pożittivi u negattivi ta' diversi biċċiet ta' informazzjoni biex tinħareġ u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' periklu ta' sustanza kimika.

Appendiċi 2

KOMPONENTI EWLENIN TAT-TEST GĦAT-TESTIJIET TAL-RHCE VALIDATI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEĦTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI U TIKKETTAR GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-GĦAJNEJN JEW GĦAL ĦSARA SERJA LILL-GĦAJNEJN

Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Protokolli	Likwidi (pipettabbli f 37±1°C jew f'temperaturi anqas għal 15-il min)	Solidi (mhux pipettabbli)	Likwidi u viskuż (pipettabbli)	Solidi (mhux pipettabbli)
Superfiċje tal-mudell	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Numru ta' repliki tat-tessuti	Tal-anqas 2	Tal-anqas 2	Tal-anqas 2	Tal-anqas 2
Kontroll ta' qabel għall-interferenza tal-kulur	50 µl + 1 ml H_2O għal 60 min f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (sustanzi kimiċi tat-test mhux ikkuluriti), jew 50 µl + 2 ml isopropanol imħallat għal 2-3h f'RT ((sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti) → jekk l-OD tas-sustanza kimika tat-test f 570±20 nm, wara t-tnaqqis tal-OD għall-isopropanol jew għall-ilma tkun > 0,08 (li tikkorrispondi għal madwar 5 % tal-OD medja tal-kontroll negattiv), għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin.	50 mg + 1 ml H_2O għal 60 min f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (sustanzi kimiċi tat-test mhux ikkuluriti) u/jew 50 mg + 2 ml isopropanol imħallat għal 2-3h f'RT (sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti u mhux ikkuluriti) → jekk l-OD tas-sustanza kimika tat-test f 570±20 nm wara t-tnaqqis tal-OD għall-isopropanol jew għall-ilma tkun > 0,08 (li tikkorrispondi għal madwar 5 % tal-OD medja tal-kontroll negattiv), għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin.	10 µl + 90 µl H_2O imħallta għal 30±2 min f'Temperatura Ambjentali (RT, 18-28°C) → jekk is-sustanza kimika tat-test tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin	10 mg + 90 µl H_2O imħallta għal 30±2 min f'RT → jekk is-sustanza kimika tat-test tieħu l-kulur, għandhom isiru kontrolli adattati ħajjin

Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kontroll ta' qabel għat-tnaqqis dirett tal-MTT	soluzzjoni ta' 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml għal 180±15-il min f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża (bħala kontroll negattiv jintuża 50 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)	soluzzjoni ta' 50 mg+ 1 ml MTT 1 mg/ml għal 180±15-il min f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bil-friża (bħala kontroll negattiv jintuża 50 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)	soluzzjoni ta' 30 µl + 300 µl MTT 1 mg/ml għal 180± 15-il min f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma (bħala kontroll negattiv jintuża 30 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)	30 mg + 300 µl MTT soluzzjoni ta' 1 mg/ml għal 180± 15-il min f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → jekk is-soluzzjoni ssir blu/vjola, għandhom isiru kontrolli adattati maqtula bl-ilma (bħala kontroll negattiv jintuża 30 µl ilma dejonizzat sterili f'soluzzjoni ta' MTT)
Qabel it-trattament	20 µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} għal 30 ± 2 min f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, protetta mid-dawl.	20 µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} għal 30 ± 2 min f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, protetta mid-dawl.	-	-
Dożi u applikazzjoni tat-trattament	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) bl-użu ta' għodda kalibrata (eż. mgħarfa livellata kalibrata biex iżżomm 50 mg klorur tas-sodju).	10 µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Għal viskuži, uża xibka tan-najlon	30 µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Ħin u temperatura tal-esponiment	30 min (± 2 min) f'medium tat-tkabbir f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	6 siegħat (± 0,25 h) f'medium tat-tkabbir f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	30 min (± 2 min) f'medium tat-tkabbir f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	4 siegħat (± 0,1 h) f'medium tat-tkabbir f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH

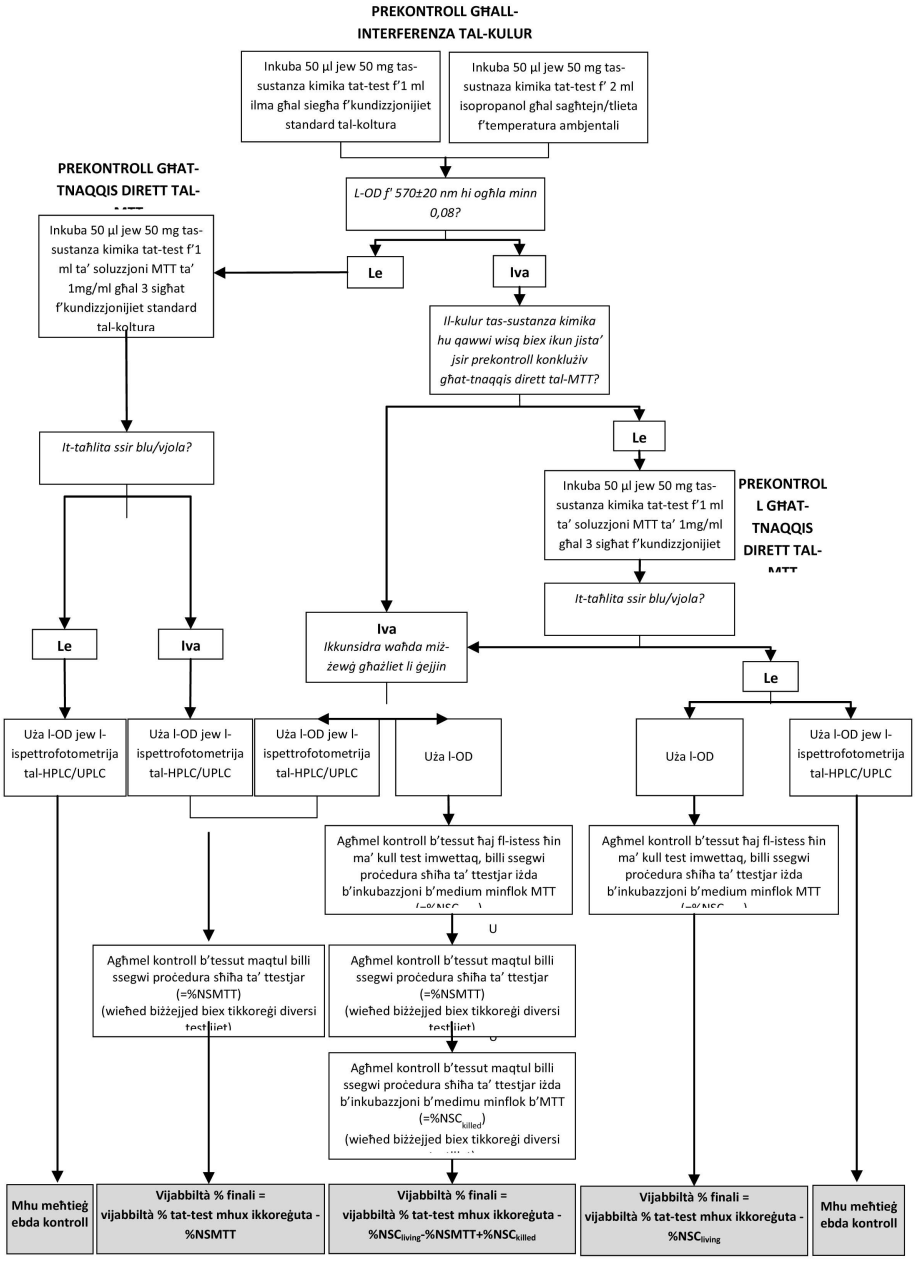
Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Tlaħlih f'temperatura ambjentali	tliet darbiet f 100 ml DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}	tliet darbiet f 100 ml DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}	20 ml DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}	25 ml DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+}
Tgħaddis ta' wara l-esponiment	12-il min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir	25 min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir	30 min (± 2 min) f 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH f'medium tat-tkabbir	30 min (± 2 min) f'RT f'medium tat-tkabbir
Inkubazzjoni ta' wara l-esponiment	120 min (± 15-il min) f'medium tat-tkabbir f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	18-il siegħa (± 0,25 ta' siegħa) f'medium tat-tkabbir f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	ebda	18-il siegħa (± 0,5 ta' siegħa) f'medium tat-tkabbir f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Kontroll negattiv	50 µl H_2O Ittestjat b'mod konkorrenti	50 µl H_2O Ittestjat b'mod konkorrenti	30 ± 2µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} Ittestjat b'mod konkorrenti	30 ± 2µl DPBS ħielsa minn Ca^{2+}/Mg^{2+} Ittestjat b'mod konkorrenti
Kontroll pożittiv	50 µl Aċetat tal-metil Ittestjat b'mod konkorrenti	50 µl Aċetat tal-metil Ittestjat b'mod konkorrenti	30 ± 2µl Aċetat tal-metil Ittestjat b'mod konkorrenti	30 ± 2µl Aċetat tal-metil Ittestjat b'mod konkorrenti

Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Soluzzjoni MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Ħin u temperatura tal-esponiment	180 min (± 15-il min) f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15-il min) f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15-il min) f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15-il min) f 37±2°C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Solvent ta' estrazzjoni	2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni b'perforazzjoni tat-tessut)	2 ml isopropanol (estrazzjoni mill-qiegħ tal-inserzjoni b'perforazzjoni tat-tessut)	1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-quċċata u mill-qiegħ tal-inserzjoni)	1,5 ml isopropanol (estrazzjoni mill-qiegħ tal-inserzjoni)
Ħin u temperatura tal-estrazzjoni	2-3 h bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT jew matul il-lejl f 4-10°C	2-3 h bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT jew matul il-lejl f 4-10°C	4 h bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT jew tal-anqas matul il-lejl minħajr tħawwid f 4-10°C	Tal-anqas saħtejn (2 h) bit-tħawwid (~120 rpm) f'RT
Qari tal-OD	570 nm (550 - 590 nm) minħajr filtru ta' riferiment	570 nm (550-590 nm) minħajr filtru ta' riferiment	570 nm (540 - 600 nm) minħajr filtru ta' riferiment	570 nm (540 - 600 nm) minħajr filtru ta' riferiment
Kontroll tal-Kwalità tat-Tessuti	Trattament b 100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Trattament b 100 µl ta' 0,3 % (v/v) Triton X-100 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Trattament ta' 30 min b'SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	Trattament ta' 30 min b'SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

Komponenti tat-Test	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	
Kriterji tal-Aċċettazzjoni	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 0,8 u < 2,5 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 30 min bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 50 % 3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 0,8 u < 2,5 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 6 sigħat bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun < 50 % 3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 1,0 u ≤ 2,5 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 30 min bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun ≤ 30 % 3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %.	1. L-OD medja tar-repliki tat-tessuti trattati bil-kontroll negattiv għandha tkun > 1,0 u ≤ 2,5 2. Il-vijabbiltà medja tar-repliki tat-tessuti esposti għal 4 sigħat bil-kontroll pożittiv, espressa bħala % tal-kontroll negattiv, għandha tkun ≤ 20 % 3. Id-differenza tal-vijabbiltà bejn żewġ repliki ta' tessuti għandha tkun anqas minn 20 %.

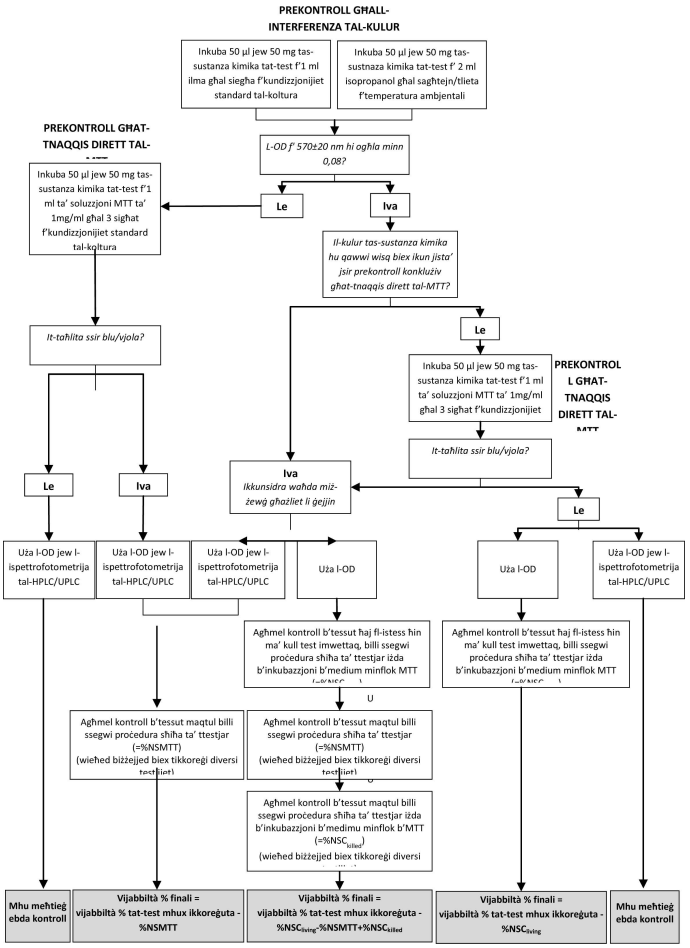
Appendiċi 3

FLOWCHART ILLUSTRATTIVA LI TIPPROVDI GWIDA DWAR KIF TIDENTIFIKA U TIMMANIĠĠJA RIDUĊENTI DIRETTI TAL-MTT U/JEW SUSTANZI KIMIĊI INTERFERENTI TAL-KULUR, FUQ IL-BAŻI TAL-SOP TAL-VRM1



Appendiċi 4

FLOWCHART ILLUSTRATTIVA LI TIPPROVDI GWIDA DWAR KIF TIDENTIFIKA U TIMMANIĠĠJA RIDUĊENTI DIRETTI TAL-MTT U/JEW SUSTANZI KIMIĊI INTERFERENTI TAL-KULUR, FUQ IL-BAŻI TAL-SOP TAL-VRM2



Appendiċi 5

PARAMETRI EWLENIN U KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI GĦALL-KWALIFIKAZZJONI TA' SISTEMA TA' SPETTROFOTOMETRIJA TAL-HPLC/UPLC GĦALL-KEJL TAL-FORMAŻAN MTT ESTRATT MILL-BINJIET TAT-TESSUTI TAL-RHCE

Parametru	Protokoll Derivat mill-Gwida tal-FDA (36)(38)	Kriterji tal-Aċċettazzjoni
Selettività	Analiżi tal-isopropanol, inbjank ħaj (estratt tal-isopropanol minn binjiet tat-tessuti tal-RhCE ħajjin mingħajr ebda trattament), inbjank mejjet (estratt tal-isopropanol minn binjiet tat-tessuti tal-RhCE maqtula mingħajr ebda trattament), u ta' kolorant (eż. blu metilen)	$Area_{interference}$ ≤ 20 % ta' $Area_{LLOQ}$ [1]
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità (jiġifieri formażan MTT f'1,6 μg/ml, 16 μg/ml u 160 μg/ml) fl-isopropanol (n=5)	CV ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Preċiżjoni	Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	%Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ
Effett tal-Matriċi	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=5)	85 % ≤ Effett tal-Matriċi % ≤ 115 %
Riport	Analiżi tal-isopropanol wara ULOQ [2] standard	$Area_{interference}$ ≤ 20 % tal-$Area_{LLOQ}$
Riproduċibbiltà (dakinhar)	3 kurvi tal-kalibrar indipendenti (fuq il-bażi ta' 6 dilwizzjonijiet ta' 1/3 konsekuttivi ta' formażan MTT fl-isopropanol mill-ULOQ, jiġifieri 200 μg/ml); Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=5)	Kurvi ta' Kalibrazzjoni: %Dev ≤ 15 % jew ≤ 20 % għal-LLOQ Kontrolli tal-Kwalità: %Dev ≤ 15 % u CV ≤ 15 %
Riproduċibbiltà (bejn ġranet differenti)	Jum 1: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 2: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3) Jum 3: Kurva ta' kalibrazzjoni 1 u Kontrolli tal-Kwalità fl-isopropanol (n=3)	
Stabbiltà fuq Terminu Qasir tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhCE	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara 24 siegħa ta' ħżin f'temperatura ambjentali	%Dev ≤ 15 %
Stabbiltà fit-Tul tal-Formażan MTT fl-Estratt tat-Tessuti tal-RhCE, jekk meħtieġa	Kontrolli tal-Kwalità fl-inbjank ħaj (n=3) analizzati dakinhar tal-preparazzjoni u wara diversi jiem ta' ħżin f'-20°C	%Dev ≤ 15 %

[1] LLOQ: Limitu Inferjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikopri vijabbiltà tat-tessuti ta' 1-2 %, jiġifieri 0,8 μg/ml.
[2] ULOQ: Limitu Superjuri ta' Kwantifikazzjoni, definit biex ikun tal-anqas id-doppju tal-ogħla konċentrazzjoni mistennija ta' formażan MTT fl-estratti tal-isopropanol mill-kontrolli negattivi (~70 μg/ml fil-VRM), jiġifieri 200 μg/ml.

B.70 **ASSAĠĠI *IN VITRO* TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU RIKOMBINANTI UMAN (hrER) BIEX JIĠU INDIVIDWATI SUSTANZI KIMIĊI B'AFFINITÀ GĦALL-IRBIT TAL-ER**

INTRODUZZJONI ĠENERALI

Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni tal-OECD

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 493 tal-OECD (2015). It-TG 493 hi linja gwida tat-test ibbażata fuq il-prestazzjoni (PBTG), li tiddeskrivi l-metodoloġija għall-assaġġi *in vitro*rikombinanti umani biex jiġu individwati sustanzi b'affinità għall-irbit tar-riċettur tal-estroġenu (assaġġi tal-irbit tal-hrER). Din tinkludi żewġ assaġġi mekkanistikament u funzjonalment simili għall-identifikazzjoni tal-leganti tar-riċettur tal-estroġenu (jiġifieri ERα) u għandha tiffaċilita l-iżvilupp ta' assaġġi simili jew modifikati ġodda skont il-prinċipji għall-validazzjoni stabbiliti fl-OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). Il-metodi ta' ttestjar ta' riferiment validati bis-sħiħ (l-Appendiċi 2 u l-Appendiċi 3) li jipprovdu l-bażi għal din il-PBTG huma:

— L-Assaġġ tal-Irbit tar-Riċettur tal-Estroġenu (ER) *In Vitro* ta' Freyberger-Wilson (FW) bl-Użu ta' ERα Rikombinanti Uman b'Tul Sħiħ (2), u

— L-Assaġġ tal-Irbit tar-Riċettur tal-Estroġenu *In Vitro* bl-Użu ta' Proteina tad-Dominju tal-Irbit tal-Ligand Rikombinanti tal-Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) (2).

L-istandards tal-prestazzjoni (PS) (3) huma disponibbli biex jiffaċilitaw l-iżvilupp u l-validazzjoni ta' metodi ta' ttestjar simili għall-istess punt ta' tmiem tal-periklu u jippermettu għall-emendar puntwali tal-PBTG 493 biex assaġġi simili ġodda jkunu jistgħu jiżdiedu ma' PBTG aġġornata. Madankollu, assaġġi ta' testijiet simili jiżdiedu biss wara rieżami u qbil mill-OECD li ntlaħqu l-istandards tal-prestazzjoni. L-assaġġi inklużi fit-TG 493 jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jiġu indirizzati r-rekwiżiti tal-pajjiżi membri tal-OECD għar-riżultati tat-testijiet dwar l-irbit tar-riċettur tal-estroġenu filwaqt li jinkiseb benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD.

Sfond u prinċipji tal-assaġġi inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar

2. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi l-linji gwida dwar it-testijiet eżistenti, u tiżviluppa linji gwida ġodda, għall-iskrinjar u għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali. Il-qafas kunċettwali (CF) tal-OECD għall-ittestjar u għall-valutazzjoni ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali ġie rivedut fl-2012. Is-CFs oriġinali u riveduti huma inklużi bħala Annessi fid-Dokument ta' Gwida dwar Linji Gwida tat-Testijiet Standardizzati għall-Evalwazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi għall-Interferenza Endokrinali (4). Is-CF jinkludi ħames livelli, b'kull livell li jikkorrispondi għal livell differenti ta' kumplessità bijoloġika. L-assaġġi tal-irbit tal-ER deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar huma l-livell 2, li jinkludi *"assaġġi in vitro li jipprovdu data dwar il-mekkaniżmu/i/il-perkors(i) endokrinali magħżula"*. Dan il-metodu ta' ttestjar hu għall-assaġġi tal-irbit tar-riċettur *in vitro* mfassla biex jidentifikaw ligandi għar-riċettur alfa tal-estroġenu uman (ERα).

3. Ir-rilevanza tal-assaġġ tal-irbit tal-ER *in vitro* għall-funzjonijiet bijoloġiċi ntweriet biċ-ċar. L-assaġġi tal-irbit tal-ER huma mfassla biex jidentifikaw sustanzi kimiċi li għandhom il-potenzjal li jinterferixxu l-perkors tal-ormon estroġenu, u ntużaw b'mod estensiv matul l-aħħar żewġ deċennji għall-karatterizzazzjoni tad-distribuzzjoni tat-tessut tal-ER kif ukoll biex jiġu identifikati l-agonisti/antagonisti tal-ER. Dawn l-assaġġi jirriflettu l-interazzjoni ligand-riċettur li hi l-ewwel pass tal-perkors ta' senjalar tal-estroġenu u essenzjali għall-funzjoni ta' riproduzzjoni fil-vertebrati kollha.

4. L-interazzjoni tal-estroġeni mal-ERs tista' taffettwa t-traskrizzjoni tal-ġeni kkontrollati mill-estroġenu u jinduċu effetti mhux ġenomiċi, li tista' twassal għall-induzzjoni jew għall-inibizzjoni ta' proċessi ċellolari, inklużi dawk neċessarji għall-proliferazzjoni taċ-ċelloli, għall-iżvilupp normali tal-fetu, u għall-funzjoni riproduttiva (5) (6) (7). Il-perturbazzjoni ta' sistemi estroġeniċi normali jista' jkollha l-potenzjal li tiskatta effetti avversi fuq l-iżvilupp normali (ontoġenesi), is-saħħa riproduttiva u l-integrità tas-sistema riproduttiva. Senjalar mhux adatt tal-ER jista' jwassal għal effetti bħal riskju akbar ta' kanċer dipendenti fuq l-ormoni, fertilità indebolita, u alterazzjonijiet fit-tkabbir u fl-iżvilupp tal-fetu (8).

5. Assaġġi tal-irbit *in vitro* huma bbażati fuq interazzjoni diretta ta' sustanza ma' sit speċifiku ta' rbit tal-ligand tar-riċettur li jirregola t-traskrizzjoni tal-ġene. Il-komponent ewlieni tal-assaġġ tal-irbit tar-riċettur alfa tal-estroġenu rikombinanti uman (hrERα) ikejjel il-ħila ta' ligand radjotikkettat ([^{3}H]17β-estradjol) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu mal-ligand radjotikkettat f'konċentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawk is-sustanzi kimiċi b'affinità inferjuri għar-riċettur. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand u tiġi dokumentata l-ispeċifiċità tal-ER, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.

6. Studji ta' validazzjoni tas-CERI u l-assaġġi tal-irbit tal-FW urew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tagħhom għall-iskop maħsub tagħhom (2).

7. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi 1.

Ambitu u limitazzjonijiet relatati mal-assaġġi tal-irbit tar-riċettur

8. Dawn l-assaġġi qed jiġu proposti għall-finijiet ta' skrinjar u ta' prijoritizzazzjoni, iżda jistgħu jipprovdu wkoll informazzjoni għal avveniment ta' inizjazzjoni molekolari (MIE) li tista' tintuża f'approċċ ta' piż tal-evidenza. Dawn jindirizzaw l-irbit kimiku mad-dominju tal-irbit tal-ligand tal-ERα f'sistema *in vitro*. B'ħekk, ir-riżultati ma għandhomx jiġu estrapolati direttament għas-sinjalar u għar-regolamentazzjoni kumplessi tas-sistema endokrinali intatta *in vivo*.

9. L-irbit tal-ligand naturali, 17β-estradjol, hu l-ewwel pass f'sensiela ta' avvenimenti molekulari li tattiva t-traskrizzjoni tal-ġeni fil-mira u, finalment, tintemm b'tibdil fiżjoloġiku (9). B'ħekk, l-irbit mad-dominju tal-irbit tal-ligand tal-ERα hu meqjus wieħed mill-mekkaniżmi ewlenin tal-interruzzjoni endokrinali (ED) medjata tal-ER, għalkemm hemm mekkaniżmi oħra li permezz tagħhom tista' sseħħ l-ED, inklużi (i) interazzjonijiet mas-siti tal-ERα li mhumiex iż-żona tal-irbit tal-ligand, (ii) interazzjonijiet ma' riċetturi oħra rilevanti għas-senjalar tal-estroġenu, riċettur tal-estroġenu akkoppjat tal-ERβ u tal-proteina-G, riċetturi oħra u sistemi enzimatiċi fi ħdan is-sistema endokrinali, (iii) sinteżi tal-ormoni, (iv) attivazzjoni metabolika u/jew inattivazzjoni tal-ormoni, (v) distribuzzjoni tal-ormoni biex jimmiraw lejn tessuti, u (vi) ikklerjar tal-ormoni mill-ġisem. L-ebda wieħed mill-assaġġi taħt dan il-metodu ta' ttestjar ma jindirizza dawn il-modalitajiet ta' azzjoni.

10. Dan il-metodu ta' ttestjar jindirizza l-ħila tas-sustanzi li jorbtu mal-ERα umana u ma jagħmilx distinzjoni bejn agonisti jew antagonisti tal-ERα. Dawn l-assaġġi ma jindirizzawx avvenimenti downstream ulterjuri bħat-traskrizzjoni tal-ġeni jew tibdiliet fiżjoloġiċi. Peress li ntużaw sustanzi monokostitwenti singli biss matul il-validazzjoni, l-applikabbiltà għat-taħlitiet tat-test ma ġietx indirizzata. L-assaġġi xorta waħda huma teorikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti u taħlitiet. Qabel ma jintuża l-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita.

11. Is-sistemi ta' riċetturi ħielsa miċ-ċelloli ma għandhom ebda kapaċità metabolika intrinsika u ma ġewx validati flimkien mas-sistemi enzimatiċi metaboliċi. Madankollu, jista' jkun possibbli li attività metabolika tiġi inkorporata f'disinn ta' studju iżda dan ikun jeħtieġ sforzi ta' validazzjoni ulterjuri.

12. Sustanzi kimiċi li jistgħu jiddenaturaw il-proteina (jiġifieri proteina tar-riċettur), bħal tensjoattivi jew sustanzi kimiċi li jistgħu jbiddlu l-pH tal-bafer tal-assaġġ, ma jistgħux jiġu ttestjati jew jistgħu jiġu ttestjati biss f'konċentrazzjonijiet nieqsa minn interazzjonijiet bħal dawn. Inkella, il-medda ta' konċentrazzjonijiet li tista' tiġi ttestjata fl-assaġġi għal sustanza kimika tat-test hi limitata mis-solubbiltà ta' din fil-bafer tal-assaġġ.

13. Għal-finijiet ta' informazzjoni, it-Tabella 1 tipprovdi r-riżultati tat-test għall-24 sustanza li ġew ittestjati fiż-żewġ assaġġi validati bis-sħiħ deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Minn dawn is-sustanzi, 17 huma klassifikati bħala leganti tal-ER u 6 bħala mhux leganti fuq il-bażi tar-rapporti ppubblikati, inklużi assaġġ tal-attivazzjoni traskrizzjonali tal-ER u/jew l-assaġġ uterotrofiku (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). B'referenza għad-*data* miġbura fil-qosor fit-Tabella 1, kien hemm qbil ta' kważi 100 % bejn iż-żewġ assaġġi dwar il-klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kollha sa 10^{-4}M, u kull sustanza ġiet klassifikata kif suppost bħala legant tal-ER jew mhux legant tal-ER. Informazzjoni supplimentari dwar dan il-grupp ta' sustanzi kif ukoll sustanzi addizzjonali ttestjati fl-assaġġi tal-irbit tal-ER matul l-istudji ta' validazzjoni hi pprovduta fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġ tal-irbit tal-hrER (3), fl-Appendiċi 2 (Tabelli 1, 2 u 3).

Tabella 1

Klassifikazzjoni tas-sustanzi bħala leganti jew mhux leganti tal-ER meta ttestjati fl-Assaġġi tal-Irbit tal-hrER FW u CERI meta mqabbla mar-rispons mistenni

	Isem is-sustanza	CAS RN	Rispons Mistenni	Assaġġ FW		Assaġġ CERI		Sustanza Kimika MESH Klassi	Klassi tal-Prodott
				Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni	Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni		
1	17β-Estradjol	50-28-2	*Legant*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Legant	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
2	Noretinodrel	68-23-5	*Legant*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Legant	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Legant	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
3	Noretindron	68-22-4	*Legant*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Legant	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Legant	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
4	Ftalat tad-di-*n*-butil	84-74-2	*Mhux legant* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant (**) ()	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Mhux Legant (**) ()	Idrokarbur (ċikliku), Ester	Plastifikant, Sustanza Intermedja
5	DES	56-53-1	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur (Ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
6	17α-etinilestradjol	57-63-6	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
7	Mmeso-Eżestrol	84-16-2	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur (Ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
8	Ġenisteina	446-72-0	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Idrokarbur (etero-ċikliku), Flavonojd	Prodott Naturali
9	Ekwol	531-95-3	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Metabolit tal-Fitoestroġenu	Prodott Naturali
10	Butil paraben (*n* butil-4-idrossibenżoat)	94-26-8	*Legant*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Legant	Paraben	Preservattiv

	Isem is-sustanza	CAS RN	Rispons Mistenni	Assaġġ FW		Assaġġ CERI		Sustanza Kimika MESH Klassi	Klassi tal-Prodott
				Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni	Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni		
11	Nonilfenol (taħlita)	84852-15-3	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Alkilfenol	Kompost Intermedju
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Organoklorur	Insettiċida
13	Kortikosteron	50-22-6	*Mhux legant* (*)	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	Mhux legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	Mhux Legant	Sterojde	Prodott Naturali
14	Zearalenon	17924-92-4	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Idrokarbur (eteroċikliku), Latton	Prodott Naturali
15	Tamossifen	10540-29-1	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Idrokarbur, (Ċikliku)	Farmaċewtiku, Aġent Veterinarju
16	5α-diidrotestosteron	521-18-6	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Sterojde, Nonfenoliku	Prodott Naturali
17	Bisfenol A	80-05-7	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Fenol	Intermedjarju Kimiku
18	4-*n*-ettilfenol	1987-50-4	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Ekwivoku [a]	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Alkilfenol	Intermedja
19	Kepon (Klordekon)	143-50-0	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Idrokarbur, (Aloġenat)	Pestiċida
20	Benż(a)antraċen	56-55-3	*Mhux Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Mhux Legant [b]	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Mhux Legant [b]	Idrokarbur Aromatiku	Intermedja
21	Enterolatton	78473-71-9	*Legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Legant	Fitoestroġenu	Prodott Naturali
22	Proġesteron	57-83-0	*Mhux legant* (*)	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	Mhux Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	Mhux Legant	Sterojde	Prodott Naturali

	Isem is-sustanza	CAS RN	Rispons Mistenni	Assaġġ FW		Assaġġ CERI		Sustanza Kimika MESH Klassi	Klassi tal-Prodott
				Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni	Konċentrazzjoni Medda (M)	Klassifikazzjoni		
23	Ottiltrietossisilan	2943-75-1	*Mhux legant*	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Mhux Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-3}$	Mhux Legant	Silan	Modifikatur tas-Superfiċje
24	Atrażina	1912-24-9	*Mhux legant* (*)	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	Mhux Legant	$1\times10^{-10} - 1\times10^{-4}$	Mhux Legant	Kompost eteroċiklu	Erbiċida

(*) Limitu tas-solubbiltà ta' $< 1 \times 10^{-4}$M.

(**) L-użu u l-klassifikazzjoni tal-ftalat tad-di-n-butil (DBP) bħala mhux legant kienu bbażati fuq l-ittestjar sa 10^{-4} M għaliex is-sustanza kienet ġiet osservata bħala insolubbli f'10^{-3}M (eż. turbidità) f'xi laboratorji matul l-istudji ta' qabel il-validazzjoni.

(+) Matul l-istudju ta' validazzjoni, il-ftalat tad-di-*n*-butil (DBP) ġie ttestjat bħala sustanza tat-test kodifikata f'konċentrazzjonijiet sa 10^{-3}M. F'dawn il-kundizzjonijiet, ċerti laboratorji osservat tnaqqis fl-irbit radjoligand fl-ogħla konċentrazzjoni (10^{-3}M) u/jew dħul ta' kurva ambigwu. Għal dawn is-sessjonijiet, id-DBP ġie klassifikat bħala "ekwivoku" jew "legant" fi tlieta minn ħames laboratorji li użaw l-assaġġ CERI u f'ħamsa minn sitt laboratorji li użaw l-assaġġ FW (ara r-Referenza (2), Taqsimiet IV.B.3a,b u VI.A).

([a]) Il-klassifikazzjoni ma kinitx konsistenti mal-klassifikazzjoni mistennija. Klassifikazzjoni ta' 4-*n*-ettilfenol bħala "ekwivoku" jew "mhux legant" fi tlieta minn ħames laboratorji rriżultat fi klassifikazzjoni medja ta' ekwivoku. Spezzjoni aktar approfondita sabet li dan kien dovut għal limitazzjonijiet tas-solubbiltà kimika li pprevjenew il-produzzjoni ta' kurva tal-irbit sħiħa.

([b]) Matul l-istudju ta' validazzjoni, il-benż(a)antraċen ġie riklassifikat bħala mhux legant (jiġifieri negattiv) fuq il-bażi tad-dokumentazzjoni ippubblikata li wriet li l-attività estroġenika *in vitro* rapportata għal din is-sustanza (16) tiddependi primarjament mill-attivazzjoni metabolika tagħha (17)(18). L-attivazzjoni metabolika enzimatika tas-sustanza ma tkunx antiċipata f'assaġġi tal-irbit tal-hrER ħielsa miċ-ċelloli kif użati f'dan l-istudju ta' validazzjoni bejn il-laboratorji. B'hekk, il-klassifikazzjoni korretta għal din is-sustanza hi "mhux legant" meta tintuża fil-kundizzjonijiet sperimentali għall-assaġġi FW u CERI.

KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER

Komponenti Essenzjali tal-Assaġġ

14. Dan il-metodu ta' ttestjar japplika għal assaġġi li jużaw riċettur tal-ER u ligand b'saħħtu biżżejjed għar-reċettur li jista' jintuża bħala markatur/traċċatur għall-assaġġ u jista' jiġi spostat b'konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. L-assaġġi leganti fihom iż-żewġ komponenti ewlenin li ġejjin: 1) irbit tas-saturazzjoni u 2) irbit kompetittiv. L-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni jintuża biex jiġu kkonfermati l-ispeċifiċità u l-attività tal-preparati tar-riċettur, filwaqt li l-esperiment tal-irbit kompetittiv jintuża biex tiġi evalwata l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li torbot mal-hrER.

Kontrolli

15. Il-bażi għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment konkorrenti proposti għandha tkun deskritta. Kontrolli konkorrenti (solvent (veikolu), pożittiv (legant tal-ER; affinità b'saħħitha u dgħajfa), negattiv (mhux legant)), kif xieraq, iservu bħala indikazzjoni li l-assaġġ hu operattiv skont il-kundizzjonijiet tat-test u jipprovdu bażi għal tqabbil bejn esperiment u ieħor; normalment dawn ikunu parti mill-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari (1). Kurvi sħaħ ta' konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dgħajjef u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom: 1) konċentrazzjoni għolja (bejn wieħed u ieħor spostament sħiħ ta' ligand radjotikkettat) u medja (madwar l-IC_{50}) ta' kull E2 u legant dgħajjef fit-triplikat; 2) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, kull wieħed fi triplikat.

Proċeduri Standard ta' Kontroll tal-Kwalità

16. Il-proċeduri standard ta' kontroll tal-kwalità għandhom isiru kif deskritt għal kull assaġġ biex jiġu żgurati riċetturi attivi, il-konċentrazzjonijiet kimiċi korretti, li l-limiti ta' tolleranza jibqgħu stabbli f'diversi repliki, u li tinżamm il-ħila li jiġu pprovduti r-risponsi mistennija ta' rbit tal-ER maż-żmien.

Wiri tal-Profiċjenza tal-Laboratorju

17. Qabel l-ittestjar ta' sustanza kimika mhux magħrufa bi kwalunkwe wieħed mill-assaġġi skont dan il-metodu ta' ttestjar, kull laboratojru għandu juri profiċjenza fl-użu tal-assaġġ billi jagħmel assaġġi tas-saturazzjoni biex jikkonferma l-ispeċifiċità u l-attività tal-preparazzjoni tal-ER, u l-assaġġi tal-irbit kompetittiv mal-estroġenu u mal-kontrolli ta' riferiment (legant dgħajjef u mhux legant). Bażi ta' *data* storika bir-riżultati għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment ġenerata minn bejn tlieta u ħames esperimenti indipendenti mwettqa f'jiem differenti għandha tkun stabbilita mil-laboratorju. Dawn l-esperimenti se jkunu l-bażi għall-estroġenu ta' riferiment u għall-kontrolli storiċi għal-laboratorju u se jintużaw bħala valutazzjoni parzjali tal-aċċettabbiltà tal-assaġġ għal sessjonijiet futuri.

18. Ir-risponsività tas-sistema tat-test tiġi kkonfermata wkoll bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza elenkati fit-Tabella 2. Il-lista ta' sustanzi ta' profiċjenza hi subsett tas-sustanzi ta' riferiment pprovduti fl-Istandards tal-Prestazzjoni għall-assaġġi tal-irbit tal-ER (3). Dawn is-sustanzi huma kummerċjalment disponibbli, jirrappreżentaw il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi assoċjati komunement mal-attività tal-irbit tal-ER, jesibixxu firxa xierqa ta' potenza mistennija għal-leganti tal-ER (jiġifieri b'saħħtu sa dgħajjef) u għal dawk mhux leganti (jiġifieri negattivi). Għal kull sustanza ta' profiċjenza, il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda pprovduta fit-Tabella 2. Għandhom isiru tal-anqas tliet esperimenti għal kull sustanza u r-riżultati għandhom ikunu konformi mal-attività kimika mistennija. Kull esperiment għandu jsir b'mod indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reaġent), bi tliet repliki għal kull konċentrazzjoni. Il-profiċjenza tintwera bil-klassifikazzjoni korretta (pożittiva/negattiva) ta' kull sustanza ta' profiċjenza. L-ittestjar tal-profiċjenza għandu jsir minn kull tekniku meta jkun qed jitgħallem l-assaġġi.

Tabella 2

Lista ta' kontrolli u ta' sustanzi ta' proficjenza għall-assaġġi tal-irbit kompetittiv tal-hrER ([87])

Nru	Isem is-sustanza	RN tas-CAS ([2])	Rispons Mistenni ([3]) ([4])	Medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (M)	Klassi kimika tal-MeSH ([5])	Klassi tal-prodott ([6])
Kontrolli (Estroġenu ta' referenza, legant dgħajjef, mhux legant)						
1	17-εστραδφολ	50-28-2	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
2	Noretinodrel (jew) Noretindron	68-23-5 (jew) 68-22-4	Legant	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
3	Ottiltrietossisilan	2943-75-1	Mhux legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silan	Modifikatur tas-superfiċje
Sustanzi ta' proficjenza ([6])						
4	Dietilstilbestrol	56-53-1	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrokarbur (ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
5	17α-etinilestradjol	57-63-6	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Sterojde	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
6	meso-Eżestrol	84-16-2	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrokarbur (ċikliku), Fenol	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
7	Tamossifen	10540-29-1	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Idrokarbur (ċikliku)	Farmaċewtiku, Aġent veterinarju
8	Ġenisteina	446-72-0	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Kompost eteroċikliku, Flavonojd,	Prodott naturali

Nru	Isem is-sustanza	RN tas-CAS (2)	Rispons Mistenni (3) (4)	Medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (M)	Klassi kimika tal-MeSH (5)	Klassi tal-prodott (6)
9	Bisfenol A	80-05-7	Legant	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenol	Intermedjarju kimiku
10	Żearalonon	17924-92-4	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Kompost eteroċikliku, Latton	Prodott Naturali
11	Butil paraben	94-26-8	Legant	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Aċidu karbossiliku, Fenol	Preservattiv
12	Atrażina	1912-24-9	Mhux legant	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Kompost eteroċikliku	Erbiċida
13	Ftalat tad-di-n-butil (DBP) (7)	84-74-2	Mhux legant (8)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Idrokarbur (ċikliku), Ester	Plastifikant, Sustanza intermedja
14	Kortikosteron	50-22-6	Mhux legant	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Sterojde	Prodott naturali

(87) Jekk sustanza ta' proficjenza ma għadhiex kummerċjalment disponibbli, tista' tintuża sustanza bl-istess klassifikazzjoni tal-irbit tal-ER, u b'potenza u bi klassi kimika komparabbli.
(2) Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi.
(3) Klassifikazzjoni bħala Legant jew Mhux Legant tal-ERαmatul l-istudju ta' validazzjoni għall-Assaġġi tal-Irbit tal-hrER CERI u FW (2).
(4) L-attività tal-irbit tal-ER kienet ibbażata fuq id-Dokumenti ta' Rieżami ta' Sfond (BRD) tal-ICCVAM għall-assaġġi tal-Irbit tal-ER u AT (9) kif ukoll fuq *data* empirika u informazzjoni oħra miksuba minn studji ta' riferiment ppubblikati u rieżaminati (10) (11) (12) (13) (14) (15).
(5) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi kimika waħda jew aktar bl-użu tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi (MeSH) tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti, skema ta' klassifikazzjoni standardizzata rikonoxxuta fil-livell internazzjonali (disponibbli fuq: http://www.nlm.nih.gov/mesh).
(6) Is-sustanzi ġew assenjati fi klassi waħda jew aktar ta' prodott bl-użu tal-Bażi ta' *Data* tas-Sustanzi Perikoluži tal-Librerija Nazzjonali tal-Mediċina tal-Istati Uniti (disponibbli fuq: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)
(7) Id-DBP jista' jintuża bħala mhux legant tal-kontroll alternattiv ittestjat b'konċentrazzjoni massima ta' 10^{-4} M.
(8) Il-limitu tas-solubbiltà għal din is-sustanza hu ta' 10^{-4} M. L-użu u l-klassifikazzjoni tal-ftalat tad-di-n-butil (DBP) bħala mhux legant kienu bbażati fuq l-ittestjar sa 10^{-4} M għaliex is-sustanza kienet ġiet osservata bħala insolubbli f'10^{-3}M (eż. turbidità) f'xi laboratorji matul l-istudji ta' qabel il-validazzjoni.

L-ittestjar tas-Solubbiltà u s-Sejbien tal-Medda ta' Konċentrazzjonijiet għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

19. Għandu jsir test preliminari biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir it-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1 mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'kontroll b'solvent flimkien ma' tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdew bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons.

Kriterji ta' Aċċettabbiltà tas-Sessjoni tat-Test

20. Aċċettazzjoni jew rifjut ta' sessjoni tat-test huma bbażati fuq l-evalwazzjoni tar-riżultati miksuba għall-estroġenu u għall-kontroll referenzjali użati għal kull esperiment. L-ewwel, għall-pjastra nru 1, il-kurvi sħaħ tal-konċentrazzjoni għall-kontrolli ta' riferiment minn kull esperiment għandhom jissodisfaw il-miżuri tal-prestazzjoni b'parametri tad-dħul ta' kurva (eż. IC_{50} u Hillslope) fuq il-bażi tar-riżultati rapportati għall-protokolli rispettivi għall-assaġġi CERI u FW (Appendiċi 2 u 3), u d-*data* storika tal-kontroll mil-laboratorju li jwettaq it-test. Il-kontrolli kollha (estroġenu ta' referenza, legant dgħajjef, u mhux legant) għandhom jiġu klassifikati kif suppost għal kull esperiment. It-tieni, il-kontrolli fuq il-pjastri sussegwenti kollha jridu jiġu vvalutati għall-konsistenza mal-pjastra nru 1. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċċata tal-kurva tal-irbit kompetittiv. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-tliet sessjonijiet indipendenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-ħila ta' twettiq tal-assaġġ b'konsistenza għandha tintwera bl-iżvilupp u biż-żamma ta' bażi ta' *data* storika għall-estroġenu u għall-kontrolli referenzjali. Id-devjazzjonijiet standard (SD) jew il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni (CV) għall-parametri ta' dħul tal-kurvi tal-estroġenu u tal-legant dgħajjef tal-kontroll referenzjali minn diversi esperimenti jistgħu jintużaw bħala kejl tar-riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju. Għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati tal-kontroll tal-pjastra minn kull sessjoni kif ukoll għal kull sustanza kimika tat-test.

Barra minn hekk, għandhom jiġu rispettati l-prinċipji li ġejjin rigward il-kriterji ta' aċċettazzjoni:

— Id-*data* għandha tkun suffiċjenti biex issir valutazzjoni kwantitattiva tal-irbit tal-ER

— Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom jibqgħu fi ħdan il-medda ta' solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test.

Analiżi tad-*data*

21. Il-proċedura definita ta' analiżi tad-*data* għas-saturazzjoni u d-*data* dwar l-irbit kompetittiv għandhom jaderixxu mal-prinċipji ewlenin għall-karatterizzazzjoni tal-interazzjonijiet riċettur-ligand. Tipikament, id-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni tiġi analizzata bl-użu ta' mudell ta' rigressjoni mhux lineari li jqis l-irbit totali u mhux speċifiku. Tista' tkun meħtieġa korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. Swillens, 1995 (19)) meta jiġu determinati l-Bmax u l-Kd. Id-*data* minn assaġġi tal-irbit kompetittiv tipikament tiġi trasformata (eż. irbit speċifiku perċentwali u konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test) (log M)). Stimi tal-log (IC_{50}) għal kull sustanza kimika tat-test għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri. Wara analiżi inizjali, għandhom isiru rieżami tal-parametri ta' dħul ta' kurva u rieżami viżwali ta' kemm id-*data* dwar l-irbit tidħol fil-kurva ta' rbit kompetittiv ġenerata. F'ċerti każijiet, tista' tkun meħtieġa analiżi addizzjonali biex jinkiseb l-aħjar dħul ta' kurva (eż. ristrezzjoni tal-quċċata u/jew tal-qiegħ tal-kurva, l-użu tar-regola tal-10 %, ara l-Appendiċi 4 u r-Referenza 2 (Taqsima III.A.2).

22. L-ilħuq tal-kriterji ta' aċċettabbiltà (paragrafu 20) jindika li s-sistema tal-assaġġ qed topera kif suppost, iżda ma jiżgurax li kwalunkwe test partikolari jipproduċi *data* preċiża. Ir-replikar tar-riżultati korretti tal-ewwel test hu l-aħjar indikazzjoni li tkun ġiet prodotta *data* preċiża.

Kriterji ta' Interpretazzjoni tad-*Data* Ġenerali

23. Bħalissa ma hemm ebda metodu miftiehem f'livell universali għall-interpretazzjoni tad-*data* dwar l-irbit tal-ER. Madankollu, kemm il-valutazzjonijiet kwalitattivi (eż. legant/mhux legant) u/jew kwantitattivi (eż. log IC_{50}, Affinità Relattiva għall-Irbit (RBA), eċċ.) tal-attività medjata bl-hrER għandhom ikunu bbażati fuq *data* empirika u ġudizzju xjentifiku solidu.

Rapport tat-Test

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

Assaġġ:

— l-assaġġ użat;

Il-kontroll/Ir-riferiment/Is-sustanza kimika tat-test

— is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli

— l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;

— il-kejl tal-pH, tal-ożmolalità u tal-preċipitat fil-medium tat-tkabbir li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— l-identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, in-numru tas-CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solvent/Veikolu:

— il-karatterizzazzjoni (natura, fornitur u lott);

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu;

— is-solubbiltà u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;

Riċetturi:

— is-sors tar-riċetturi (fornitur, Nru tal-katalogu, lott, speċi tar-riċettur, konċentrazzjoni attiva tar-riċettur ipprovduta mill-fornitur, ċertifikazzjoni mingħand il-fornitur)

— karatterizzazzjoni tar-riċetturi (inklużi r-riżultati tal-irbit tas-saturazzjoni): Kd, Bmax,

— ħżin tar-riċetturi

— ligand radjotikkettat:

— fornitur, Nru tal-katalogu., lott, attività speċifika

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— limitazzjonijiet tas-solubbiltà skont il-kundizzjonijiet tal-assaġġ;

— il-kompożizzjoni tal-bafer tal-irbit;

— il-konċentrazzjoni tar-riċettur;

— il-konċentrazzjoni tat-traċċatur (jiġifieri ligand radjotikkettat);

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

— il-veikolu perċentwali fl-assaġġ finali;

— it-temperatura u l-ħin tal-inkubazzjoni;

— il-metodu tal-irbit/tas-separazzjoni libera;

— il-kontrolli pożittivi u negattivi/l-istandards referenzjarji;

— il-kriterji biex it-testijiet jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

Kontroll tal-aċċettabbiltà:

— il-valuri attwali tal-IC_{50} u tal-Hillslope għall-kontrolli pożittivi konkorrenti/għas-sustanzi referenzjali;

Ir-riżultati:

— *data* mhux proċessata u marbuta/libera;

— kontroll tal-konferma tad-denaturazzjoni, jekk xieraq;

— jekk teżisti, l-anqas konċentrazzjoni effettiva (LEC);

— il-valuri tal-RBA u/jew tal-IC_{50} kif xieraq;

— ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,

— analiżijiet statistiċi, jekk jeżistu, flimkien ma' kejl tal-errur u tal-kunfidenza (eż. SEM, SD, CV jew CI ta' 95 %) u deskrizzjoni ta' kif inkisbu dawn il-valuri;

Diskussjoni tar-riżultati:

— applikazzjoni tar-regola tal-10 %

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr.* Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. u Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol.* Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Parigi.

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Ġappun. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Ittri, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol*. Ittri, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET U ABBREVJAZZJONIJIET

Ir-Regola tal-10 %: L-għażla li mill-analiżijiet jiġu eskluży l-punti tad-*data* fejn il-medja tar-repliki għal-limitu speċifiku tal-[^{3}H]17β-estradjol tkun 10 % jew aktar minn dik osservata għall-valur medju f'konċentrazzjoni inferjuri (ara l-Appendiċi 4).

Kriterji ta' aċċettabbiltà: L-istandards minimi għat-twettiq tal-kontrolli sperimentali u l-istandards referenzjarji. Il-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha għandhom jiġu ssodisfati biex esperiment jitqies validu.

Akkuratezza (konkordanza): Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-assaġġ u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tal-assaġġ u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' assaġġ (1).

CF: Il-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Evalwazzjoni tal-Interferenti Endorkinali.

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita.

CV: Koeffiċjent ta' varjazzjoni

E2: 17β-estradjol

ED: Interferenza endokrinali

hERα:: Riċettur alfa tal-estroġenu uman

ER: Riċettur tal-Estroġenu

Attività estroġenika: Il-kapaċità ta' sustanza kimika li timita 17β-estradjol fil-ħila tiegħu li jorbot riċetturi tal-estroġenu. L-irbit mal-hERα jista' jiġi individwat b'dan il-metodu ta' ttestjar.

IC50: Il-konċentrazzjoni effettiva medjana ta' sustanza kimika tat-test inibitorja.

ICCVAM: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl ta' kemm laboraotrji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi, jistgħu jipproduċu riżultati kwalitattivament u kwantitattivament simili. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hi determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm assaġġ jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (1).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jistgħu jirreplikaw b'suċċess ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku f'ħinijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll "riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju" (1).

LEC: L-anqas konċentrazzjoni effettiva hi l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tipproduċi rispons (jiġifieri l-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha l-induzzjoni tad-drabi tkun statistikament differenti mill-kontroll b'veikolu konkorrenti).

Test me-too: Espressjoni kollokwjali għal assaġġ li jkun strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' riferiment validat u aċċettat. Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili

PBTG: Linja Gwida tat-Test Ibbażata fuq il-Prestazzjoni

Standards tal-prestazzjoni: Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validat, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' assaġġ propost li hu simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Inklużi hemm (1) il-komponenti essenzjali tal-assaġġ; (2) lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati biex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (3) il-livelli komparabbli ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà, fuq il-bażi ta' dak li nkiseb għall-assaġġ validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta evalwat bl-użu tal-lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' riferiment (1).

Sustanzi ta' proficjenza: Subsett tas-Sustanzi ta' riferiment inklużi fl-Istandards tal-Prestazzjoni li jistgħu jintużaw mil-laboratorji biex tintwera kompetenza teknika b'assaġġ standardizzat. Il-kriterji tal-għażla għal dawn is-sustanzi tipikament jinkludu li dawk jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi, ikunu kummerċjalment disponibbli, u jkollhom *data* ta' riferiment ta' kwalità għolja disponibbli.

Proficjenza: Il-ħila murija biex jitwettaq assaġġ kif suppost qabel l-ittestjar ta' sustanza mhux magħrufa.

Estroġenu ta' riferiment: 17ß-estradjol (E2, CAS 50-28-2).

Metodi ta' ttestjar ta' riferiment: L-assaġġi li fuqhom hi bbażata PBTG 493.

RBA: Affinità Relattiva għall-Irbit. L-RBA ta' sustanza tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC_{50}) għas-sustanza relattiva għal-log (IC_{50}) għal 17β-estradjol

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni ta' assaġġ mal-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm l-assaġġ għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-preċiżjoni (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar) (1).

Affidabbiltà: Kejl ta' kemm assaġġ jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduttività ta' fost u bejn il-laboratorji.

SD: Devjazzjoni standard.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Metodu ta' ttestjar validat: Assaġġ li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni biex tiġi determinata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabbiltà għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar validat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u ta' affidabbiltà biex jitqies aċċettabli għall-għan propost (1).

Validazzjoni: Il-proċess li bih l-affidabbiltà u r-rilevanza ta' approċċ, ta' metodu, ta' assaġġ, ta' proċess jew ta' valutazzjoni partikolari jkunu stabbiliti għal għan definit (1).

Appendiċi 2

L-ASSAĠĠI IN VITRO TAL-IRBIT TAS-SATURAZZJONI U KOMPETITTIV TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU (ERA) TA' FREYBERGER-WILSON BL-UŻU TAL-ERA RIKOMBINANTI B'TUL SĦIĦ

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. Dan l-assaġġ *in vitro* tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv tar-Riċettur tal-Estroġenu (ERα) juża r-riċettur uman b'tul sħiħ ERα(hrERα) li hu prodott f'ċelloli ta' insetti infettati bil-bakulovajrus u iżolat minnhom. Il-protokoll, żviluppat minn Freyberger u Wilson, għadda minn studju ta' validazzjoni multilaboratorju internazzjonali (2) li wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tiegħu għall-iskop maħsub tal-assaġġ.

2. Dan l-assaġġ hu proċedura ta' skrinjar għall-identifikazzjoni ta' sustanzi li jistgħu jorbtu mal-hrERα b'tul sħiħ. Jintuża biex jiddetermina l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tikkompeti ma' 17β-estradjol għall-irbit mal-hrERα. Ir-riżultati kwantitattivi tal-assaġġ jistgħu jinkludu l-IC_{50} (kejl tal-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test meħtieġa biex jiġi spostat nofs l-[^{3}H]-17β-estradjol mill-hrERα) u l-affinitajiet għall-irbit relattiv tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-hrERα meta mqabbel ma' 17β-estradjol. Għall-finijiet ta' skrinjar tas-sustanzi kimiċi, ir-riżultati kwalitattivi aċċettabbli tal-assaġġ jistgħu jinkludu klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test bħala leganti tal-hrERα, mhux leganti, jew ekwivoċi fuq il-bażi tal-kriterji deskritti għall-kurvi tal-irbit.

3. L-assaġġ juża ligand radjuattiv li jeħtieġ liċenzja tal-materjali radjuattivi għal-laboratorju. Il-proċeduri kollha b'radjoisotopi u b'sustanzi kimiċi perikoluži għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri deskritti mil-leġiżlazzjoni nazzjonali.

4. Għandhom jinqraw **INTRODUZZJONI ĠENERALI** u **KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER** qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJI TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. L-assaġġ tal-irbit tal-hrERα jkejjel il-ħila ta' ligand radjotikkettat ([3H]17β-estradjol) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu mal-ligand radjotikkettat f'konċentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawk is-sustanzi kimiċi b'affinità inferjuri għar-riċettur.

6. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.

7. L-iskop tal-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni hu li jikkaratterizza lott partikolari ta' riċetturi għall-affinità u n-numru tal-irbit bi tħejjija għall-esperiment tal-irbit kompetittiv. L-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni jkejjel, taħt kundizzjonijiet ta' ekwilibriju, l-affinità ta' konċentrazzjoni fissa tar-riċettur tal-estroġenu għal-ligand naturali tiegħu (rappreżentat mill-kostanti ta' dissoċjazzjoni, Kd), u l-konċentrazzjoni tas-siti attivi tar-riċettur (Bmax).

8. L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-affinità ta' sustanza biex tikkompeti ma' [3H]17β-estradjol għall-irbit mal-ER. L-affinità hi kwantifikata mill-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li, f'ekwilibriju, tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku tal-[3H]17β-estradjol (imsejħa l-konċentrazzjoni inibitorja 50 % jew IC50). Din tista tiġi evalwata wkoll bl-użu tal-affinità relattiva għall-irbit (RBA, relattiva għall-IC50 tal-estradjol imkejla b'mod separat fl-istess sessjoni). L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' [3H]17β-estradjol f'konċentrazzjoni fissa fil-preżenza ta' firxa wiesgħa (tmien ordnijiet ta' kobor) tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad id-*data* tiddaħħal, fejn possibbli, biex tifforma l-ekwazzjoni ta' Hill (Hill, 1910) li tiddeskrivi l-ispostament tar-radjoligand minn legant kompetittiv ta' sit wieħed. Il-firxa tal-ispostament tal-estradjol radjotikkettat fl-ekwilibriju tintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi karatterizzata bħala legant, mhux legant, jew waħda li tiġġenera rispons ekwivoku.

PROĊEDURA

Wiri ta' Prestazzjoni Aċċettabbli tal-Proteina tal-hrERα

9. Qabel it-twettiq ta' rutina tal-assaġġi tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv, għandu jintwera li kull lott ġdid tal-hrERα jkollu prestazzjoni korretta fil-laboratorju fejn se jintuża. Għandu jintuża proċess imqassam fuq żewġ stadji biex tintwera l-prestazzjoni. Dawn l-istadji huma dawn li ġejjin:

— Agħmel assaġġ tal-irbit ta' [^{3}H]-17β-estradjol tas-saturazzjoni biex turi l-ispeċifiċità u s-saturazzjoni tal-hrERα. Analiżi ta' rigressjoni nonlineari ta' din id-*data* (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) u l-plott Scatchard sussegwenti għandha tiddokumenta l-affinità għall-irbit tal-hrERα ta' [^{3}H]-17β-estradjol (Kd) u n-numru ta' riċetturi (Bmax) għal kull lott tal-hrERα.

— Agħmel assaġġ tal-irbit kompetittiv billi tuża s-sustanzi tal-kontroll (estroġenu ta' riferiment (17β-estradjol)), legant dgħajjef (eż. noretinodrel jew noretindron), u mhux legant (ottiltrietossisilan, OTES). Kull laboratorju għandu jistabbilixxi bażi ta' *data* storika biex jiddokumenta l-konsistenza tal-IC_{50} u ta' valuri rilevanti oħra għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef fost l-esperimenti u l-lottijiet differenti tal-hrERα. Il-parametri tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għas-sustanzi tal-kontroll għandhom ikunu fi ħdan il-limiti tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (ara t-Tabella 1) li ġew żviluppati bl-użu tad-*data* mil-laboratorji li ħadu sehem fl-istudju ta' validazzjoni għal dan l-assaġġ (2).

Tabella 1

Kriterji tal-prestazzjoni żviluppati għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef, Assaġġ FW tal-Irbit tal-hrER.

Sustanza	Parametru	Medja [a]	Devjazzjoni Standard X (n)	Intervall ta' Kunfidenza ta' 95 % [b]	
				Limitu Inferjuri	Limitu Superjuri
17β-estradjol	Quċċata (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Qiegħ (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Pendil ta' Hill	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	LogIC_{50} (M)	-8,92 [c]	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Noretinodrel	Quċċata (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Qiegħ (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Pendil ta' Hill	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC_{50} (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindron[c] [c]	Quċċata (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Qiegħ (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Pendil ta' Hill	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	LogIC_{50}(M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

[a] Medja (n) ± Devjazzjoni Standard (SD) ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi tal-parametri ta' dħul ta' kurva (Ekwazzjoni ta' Hill b'erba parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'erba laboratorji matul l-istudju ta' validazzjoni (ara l-Anness N tar-Referenza 2).

[b] L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti bħala gwida għall-kriterji ta' aċċettabbiltà.

[c] L-ittestjar tan-noretindron kien fakultattiv għas-Subkompitu matul l-istudju ta' validazzjoni (ara r-Referenza 2, ara s-Subkompitu 4). B'ħekk, ± SD (n) medji ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi ta' dħul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b4 parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa fżewġ laboratorji.

Il-medda għall-IC_{50}*se tkun dipendenti fuq il-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u l-konċentrazzjoni tal-ligand radjotikkettat użati fi ħdan kull laboratorju. Ikun aċċettabbli aġġustament xieraq għall-medda tal-*IC_{50}*fuq il-bażi tal-kundizzjonijiet użati għat-twettiq tal-assaġġ.*

Wiri tal-profiċjenza tal-laboratorju

10. Ara l-paragrafi 17 u 18 u t-Tabella 2 f**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Kull assaġġ (irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv) għandu jikkonsisti fi tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reaġenti) f'jiem differenti, u kull sessjoni għandu jkun fiha tliet repliki.

Determinazzjoni tal-Konċentrazzjoni tar-Riċettur (hrERα)

11. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv tvarja ftit skont il-lott u l-kundizzjonijiet tal-ħżin. Għalhekk, għandha tiġi determinata l-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv kif riċevuta mingħand il-fornitur. Din trendi l-konċentrazzjoni xierqa tar-riċettur attiv fil-ħin tas-sessjoni.

12. Skont il-kundizzjonijiet li jikkorrispondu għall-irbit kompetittiv (jiġifieri 1 nM [^{3}H]-estradjol), konċentrazzjonijiet nominali ta' riċettur ta' 0,25, ta' 0,5, ta' 0,75, u ta' 1 nM għandhom jiġu inkubati fl-assenza (irbit totali) u fil-preżenza (irbit mhux speċifiku ta' 1 μM estradjol mhux tikkettat. L-irbit speċifiku, ikkalkolat bħala d-differenza tal-irbit totali u mhux speċifiku, jiġi plottjat kontra l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti valuri tal-irbit speċifiċi li jikkorrispondu għal 20 % tar-radjotikketta miżjuda hi relatata mal-konċentrazzjoni nominali korrispondenti tar-riċettur, u din il-konċentrazzjoni tar-riċettur għandha tintuża għall-esperimenti tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv. Spiss, konċentrazzjoni finali tal-hrER ta' 0,5 nM se tkun konformi ma' din il-kundizzjoni.

13. Jekk il-kriterju ta' 20 % ma jkunx jista' jiġi ssodisfat ripetutament, il-kompożizzjoni tal-esperiment għandha tiġi verifikata għal żbalji potenzjali. Nuqqas ta' lħuq tal-kriterju ta' 20 % jista' jindika li ftit li xejn ikun hemm riċettur attiv fil-lott rikombinanti, u mbagħad ikollu jiġi kkunsidrat l-użu ta' lott ieħor tar-riċettur.

Assaġġ tas-saturazzjoni

14. Tmien konċentrazzjonijiet li jiżdiedu dejjem aktar ta' [^{3}H]17β-estradjol għandhom jiġu evalwati fi triplikat, skont it-tliet kundizzjonijiet li ġejjin (ara t-Tabella 2):

— Fin-nuqqas ta' 17β-estradjol mhux tikkettat u l-preżenza ta' ER. Din hi d-determinazzjoni tal-irbit totali skont il-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet li jkollhom [3H]17β-estradjol biss.

— Fil-preżenza ta' konċentrazzjoni eċċessiva għal 1 000 darba ta' 17β-estradjol mhux tikkettat fuq 17β-estradjol tikkettat u fil-preżenza tal-ER. L-intenzjoni ta' din il-kundizzjoni hi li tissatura s-siti attivi tal-irbit b'17β-estradjol mhux tikkettat, u bil-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet, tiddetermina l-irbit mhux speċifiku. Kwalunkwe estradjol jaħraq li jifdal li jista' jorbot mar-riċettur jitqies li jkun jorbot ma' sit mhux speċifiku peress li l-estradjol kiesaħ għandu jkun f'konċentrazzjoni għolja tant li jintrabat mas-siti speċifiċi disponibbli kollha fuq ir-riċettur.

— Fin-nuqqas ta' 17β-estradjol mhux tikkettat u l-assenza tal-ER (determinazzjoni tar-radjuattività totali)

Preparazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol u ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettati

15. Id-dilwizzjonijiet ta' [^{3}H]-17β-estradjol għandhom jitħejjew billi jiżdied bafer tal-assaġġ sa soluzzjoni ewlenija ta' 12-il nM ta' [^{3}H]-17β-estradjol biex jinkisbu konċentrazzjonijiet li inizjalment ivarjaw minn 0,12nM sa 12 nM. Billi jiżdiedu 40 μl ta' dawn is-soluzzjonijiet għall-bwejriet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (f'volum finali ta' 160 μl), jinkisbu l-konċentrazzjonijiet tal-assaġġ finali, li jvarjaw bejn 0,03 u 3,0 nM. Preparazzjoni tal-bafer tal-assaġġ, tas-soluzzjoni ewlenija ta' [^{3}H]-17β-estradjol u tad-dilwizzjonijiet u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet huma deskritti fid-dettall fil-protokoll FW (2).

16. Id-dilwizzjonijiet ta' soluzzjonijiet etanoloġiċi ta' 17β-estradjol għandhom jitħejjew billi jiżdied bafer tal-assaġġ biex jinkisbu tmien konċentrazzjonijiet waħda akbar mill-oħra li inizjalment ivarjaw bejn 0,06 μM u 6 μM. Billi jiżdiedu 80 μl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (f'volum finali ta' 160 μl), jinkisbu l-konċentrazzjonijiet tal-assaġġ finali, li jvarjaw bejn 0,03μM u 3μM. Il-konċentrazzjoni finali ta' 17β-estradjol mhux tikkettat fil-bwejriet individwali tal-assaġġ tal-irbit mhux speċifiku għandha tkun 1 000 darba l-konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β- estradjol tikkettat. Il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat hi deskritta fid-dettall fil-protokoll FW (2).

17. Għandha tintuża l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur li tagħti l-irbit speċifiku ta' 20±5 % (ara l-paragrafi 12-13). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha titħejja eżatt qabel l-użu.

18. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra jitħejjew kif muri fit-Tabella 2, bi tliet repliki għal kull konċentrazzjoni. Eżempju ta' konċentrazzjoni tal-pjastri u ta' assenjament tal-volum ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' 17β-estradjol mhux tikkettat, tal-bafer u tar-riċettur hu pprovdut fl-Appendiċi 2.2.

Tabella 2

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Irbit Totali (Solvent)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2 + ER+ 0,10 μM E_2			Irbit Mhux Speċifiku
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 μM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E_2			
F													
G													
H													

[3H] E2:: [3H]-17β-estradjol
ER:: riċettur tal-estroġenu
E_2:: 17β-estradjol mhux tikkettat

19. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'2° sa 8°C għal 16 sa 20 siegħa u jitqiegħdu fuq rotatur matul il-perjodu ta' inkubazzjoni.

Kejl ta' [3H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα

20. [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα għandu jiġi separat minn [^{3}H]-17β-Estradjol ħieles billi tiżdied sospensjoni ta' 80 μl DCC kiesaħ f'kull pjastra, filwaqt li l-pjastri għall-mikrotitraġġ jitħawdu għal 10 minuti u jiġu ċentrifugati għal 10 minuti f'madwar 2 500 RPM. Biex tiġi minimizzata d-dissoċjazzjoni tal-[^{3}H]-17β-estradjol marbut mill-hrERα matul dan il-proċess, hu estremament importanti li l-bafers u l-bwejriet tal-assaġġ jinżammu f'bejn 2 u 8°C u li kull stadju jitwettaq malajr. Xejker għall-pjastri għall-mikrotitraġġ hu neċessarju biex il-pjastri jiġu proċessati b'mod effiċjenti u veloċi.

21. Imbagħad 50 μl supernatant li fih [^{3}H]-17β-estradjol marbut mal-hrERα għandu jittieħed b'attenzjoni estrema, biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni tal-bwejriet bil-mess tad-DCC, u għandu jitqiegħed fuq it-tieni pjastra għall-mikrotitraġġ.

22. Imbagħad 200 μl fluwidu ta' xintillazzjoni, li kapaċi jikkonverti l-enerġija kinetika tal-emissjonijiet nukleari f'enerġija tad-dawl, għandu jiżdied f'kull bwejra (A1-B12 u D1 sa E12). Il-bwejriet G1-H12 (identifikati bħala dpms totali) jirrappreżentaw dilwizzjonijiet serjali ta' [^{3}H]-17β-estradjol (40 μl) li għandhom jitwasslu direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejriet tal-pjastra tal-kejl kif indikat fit-Tabella 3, jiġifieri dawn il-bwejriet fihom biss 200 μl fluwidu ta' xintillazzjoni u d-dilwizzjoni xierqa ta' [3H]-17β-estradjol. Dawn il-miżuri juru kemm [^{3}H]-17β-estradjol f'dpms żdied ma' kull sett ta' bwejriet għall-irbit totali u għall-irbit mhux speċifiku.

Tabella 3

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni, Kejl tar-Radjuattività

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3} H] E_2 + ER			Irbit Totali (Solvent)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 µM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 µM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 µM E_2			0,10 nM [3H] E_2 + ER+ 0,10 µM E_2			Irbit Mhux Speċifiku
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 µM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 µM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER + 1,0 µM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 µM E_2			
F													
G	0,03 nM [3H] E_2 (dpms totali)			0,06 nM [3H] E_2			0,08 nM [3H] E_2			0,10 nM [3H] E_2			Dpms totali (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2			

[3H] E2:: [3H]-17β-estradjol
ER:: riċettur tal-estroġenu
E2:: 17β-estradjol mhux tikkettat
dpms:: diżintegrazzjonijiet fil-minuta
(*) Hawnhekk, id-dilwizzjonijiet serjali jaħarqu ta' estradjol tikkettat [^{3}H] għandhom jiżdiedu direttament f'200 µl fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejriet G1 – H12.

23. Il-kejl għandu jibda wara tal-anqas sagħtejn u l-ħin tal-għadd għandu jkun ta' 40 minuta għal kull bwejra. L-apparat li jkejjel ix-xintillazzjoni tal-pjastri għall-mikrotitraġġ għandu jintuża għad-determinazzjoni tad-dpm/bwejra b'korrezzjoni għall-estinzjoni. Inkella, jekk ma jkunx hemm apparat disponibbli għall-kejl tax-xintillazzjoni għal pjastra għall-mikrotitraġġ, il-kampjuni jistgħu jitkejlu f'apparat konvenzjonali għall-kejl. F'dawn il-kundizzjonijiet, jista' jiġi kkunsidrat tnaqqis fil-ħin tal-għadd.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

24. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [^{3}H]-17β- estradjol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw tliet repliki konkorrenti f'kull konċentrazzjoni fi ħdan sessjoni waħda. Barra minn hekk, għandhom isiru tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għal kull sustanza kimika ttestjata. L-assaġġ għandu jsir fi pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra

Kontrolli

25. Meta jsir l-assaġġ, is-solvent u l-kontrolli konkorrenti (jiġifieri l-estroġenu referenzjarju, il-legant dgħajjef, u dak mhux legant) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Kurvi sħaħ ta' konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dgħajjef u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (bejn wieħed u ieħor l-IC_{50}) kull waħda ta' E2 u ta' legant dgħajjef fi triplikat; (ii) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, tal-anqas kull wieħed fi triplikat. Il-proċeduri għat-tħejjija tal-bafer tal-assaġġ, tal-kontrolli, ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' hrERα u tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma deskritti fir-Referenza 2 (Anness K, ara l-Protokoll tal-Assaġġ FW).

Kontroll b'solvent:

26. Il-kontroll b'solvent jindika li s-solvent ma jinteraġixxix mas-sistema tat-test u jkejjel ukoll l-irbit totali (TB). L-etanol hu s-solvent preferut. Inkella, jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fl-etanol, jista' jintuża DMSO. Il-konċentrazzjoni ta' etanol jew ta' DMSO, jekk użat, fil-bwejriet finali hi ta' 1,5 % u ma tistax taqbeż it-2 %.

Kontroll bil-bafer:

27. Il-kontroll bil-bafer (BC) la għandu jkun fih solvent u lanqas is-sustanza kimika tat-test, iżda għandu jkun fih il-komponenti l-oħra kollha tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bil-bafer jitqabblu mal-kontroll b'solvent biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ.

Legant b'saħħtu (estroġenu ta' riferiment)

28. 17β-estradjol (CAS 50-28-2) hu l-ligand endoġenu u jorbot b'affinità għolja mal-ER, subtip tal-alfa. Kurva standard li tuża 17β-estradjol mhux tikkettat għandha titħejja għal kull assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrERα, biex tkun tista ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien fi ħdan l-istess laboratorju. Tmien soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jitħejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ li jvarjaw minn 100 nM – 10 pM (-7[logM] sa -11[logM]), imqassma kif ġej: (-7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]). L-ogħla konċentrazzjoni ta' 17β-estradjol mhux tikkettat (1 μM) isservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku. Din il-konċentrazzjoni hi distinta bit-tikketta NSB fit-Tabella 4 għalkemm hi wkoll parti mill-kurva standard.

Legant dgħajjef

29. Legant dgħajjef (noretinodrel (CAS68-23-5) jew noretindron (CAS 68-22-4)) għandu jkun inkluż biex tintwera s-sensittività ta' kull esperiment u tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien. Tmien soluzzjonijiet tal-legant dgħajjef għandhom jitħejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ li jvarjaw minn 3 nM sa 30 μM (-8,5[logM] sa -4,5[logM]), imqassma kif ġej: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM],-7,5[logM], -8,5[logM].

Mhux legant

30. Ottiltrietossisilan (OTES, CAS 2943-75-1) għandu jintuża bħala l-kontroll negattiv (mhux legant). Dan jipprovdi garanzija li l-assaġġ kif imwettaq isib meta s-sustanzi kimiċi tat-test ma jorbtux mal-hrERα. Tmien soluzzjonijiet ta' mhux legant għandhom jitħejjew fl-etanol, bil-konċentrazzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ li jvarjaw minn 0,1nM sa 1 000 μM (-10[logM] sa -3[logM]), f'inkrementi tal-log. Il-ftalat tad-di-*n*-butil (DBP) jista' jintuża bħala mhux legant tal-kontroll alternattiv. Is-solubbiltà massima tiegħu ntweriet li hi -4[logM].

Konċentrazzjoni tal-hrERα

31. Għandu jintuża l-ammont tar-riċettur li jagħti l-irbit speċifiku ta' 20±5 % ta' 1 nM radjoligand (ara l-paragrafi 12-13 tal-Appendiċi 2). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha titħejja eżatt qabel l-użu.

[3H]-17β-estradjol

32. Il-konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol fil-bwejriet tal-assaġġ għandha tkun ta' 1,0 nM.

Sustanzi Kimiċi tat-Test

33. L-ewwel nett, hemm bżonn li jsir test tas-solubbiltà biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir il-protokoll tat-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1 mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jikkonsisti f'kontroll b'solvent flimkien ma' tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdew bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat (ara wkoll il-paragrafu 35). Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata bl-użu tal-kurvi spazjati tal-konċentrazzjoni bi tmien logs kif definiti mit-test preċedenti ta' sejbien tal-medda. Il-konċentrazzjonijiet fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons.

34. Id-dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jitħejjew fis-solvent xieraq (ara l-paragrafu 26 tal-Appendiċi 2). Jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fl-etanol jew fid-DMSO, u ż-żieda ta' aktar solvent tkun tirriżulta f'konċentrazzjoni tas-solvent ogħla mil-limitu aċċettabbli fit-tubu finali, l-ogħla konċentrazzjoni tista' titnaqqas għall-anqas konċentrazzjoni li jmiss. F'dan il-każ, konċentrazzjoni addizzjonali tista' tiżdied fil-limitu inferjuri tas-serje ta' konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet oħra fis-serje għandhom jibqgħu l-istess.

35. Is-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ssorveljati bir-reqqa meta jiżdiedu mal-bwejra tal-assaġġ, peress li s-sustanza kimika tat-test tista' tfur barra maż-żieda fil-bwejra tal-assaġġ. Id-*data* għall-bwejriet kollha li fihom il-preċipitat għandha tkun eskluża mid-dħul ta' kurva, u r-raġuni għall-esklużjoni tad-*data* għandha tiġi nnotata.

36. Jekk hemm informazzjoni eżistenti preċedenti minn sorsi oħra li jipprovdu log(IC_{50}) ta' sustanza kimika tat-test, jista jkun xieraq li d-dilwizzjonijiet jitqassmu ġeometrikament (jiġifieri 0,5 unitajiet ta' log madwar il-log mistenni log(IC_{50}). Ir-riżultat finali għandu jirrifletti tifrix suffiċjenti tal-konċentrazzjonijiet fuq iż-żewġ naħat tal-log(IC_{50}), inklużi l-quċċata u l-qiegħ, b'tali mod li l-kurva tal-irbit tkun tista tiġi karatterizzata b'mod adegwat.

Organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ

37. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tikkettatti għandhom jitħejjew b'kunsiderazzjoni ta' inkubazzjonijiet sestupli b'kodiċijiet għall-kontroll b'solvent, bl-ogħla konċentrazzjoni tal-estroġenu referenzjarju li sservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku (NSB), u bil-kontroll b'bafer u b'kunsiderazzjoni tal-inkubazzjonijiet triplikati bil-kodiċijiet għal kull waħda mit-tmien konċentrazzjonijiet tal-kontroll li ma jorbotx (ottiltrietossisilan), bis-seba' konċentrazzjonijiet inferjuri għall-estroġenu referenzjarju, bit-tmien livelli tad-doża tal-konċentrazzjonijiet tal-legant dgħajjef, u bit-tmien konċentrazzjonijiet ta' kull sustanza kimika tat-test (TC). Tifsila indikattiva tad-dijagramma tal-pjastra għall-kurvi sħaħ tal-konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontroll referenzjarji hi mogħtija hawn taħt fit-Tabella 4. Jintużaw pjastri addizzjonali għall-mikrotitraġġ għas-sustanzi kimiċi tat-test u dawn għandhom jinkludu kontrolli tal-pjastra (jiġifieri 1) u konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (madwar l-IC_{50}) kull waħda ta' E2 u legant dgħajjef fi triplikat; 2) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, kull wieħed f'sestuplu (Tabella 5). Eżempju ta' worksheet tat-tifsila tal-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ kompetittiv bl-użu ta' tliet sustanzi kimiċi tat-test mhux magħrufa hu pprovdut fl-Appendiċi 2.3. Il-konċentrazzjonijiet indikati fit-Tabelli 4 u 5 huma l-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni masisma għall-E2 għandha tkun ta' 1×10^{-7} M u għal-legant dgħajjef għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni użata għal-legant dgħajjef fil-pjastra 1. Il-konċentrazzjoni tal-IC_{50} trid tiġi determinata mil-laboratorju fuq il-bażi tal-bażi ta' *data* tal-kontroll storiku tiegħu. Hu mistenni li dan il-valur ikun simili għal dak osservat fl-istudji ta' validazzjoni (ara t-Tabella 1).

Tabella 4

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Kurvi Sħaħ ta' Konċentrazzjoni għal Estroġenu u għal Kontrolli Referenzjarji (Pjastra 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB (Solvent biss)			TB (Solvent biss)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10-7)			E2 (1×10-8)			E2 (1×10-8,5)			E2 (1×10-9)		
C	E2 (1×10-9,5)			E2 (1×10-10)			E2 (1×10-11)			Inbjank (*)		
D	NE (1×10-4,5)			NE (1×10-5)			NE (1×10-5,5)			NE (1×10-6)		
E	NE (1×10-6,5)			NE (1×10-7)			NE (1×10-7,5)			NE (1×10-8,5)		
F	OTES (1×10-3)			OTES (1×10-4)			OTES (1×10-5)			OTES (1×10-6)		
G	OTES (1×10-7)			OTES (1×10-8)			OTES (1×10-9)			OTES (1×10-10)		
H	Inbjank (għal dak jaħraq) (**)			Inbjank (għal dak jaħraq) (**)			Kontroll bil-bafer			Kontroll bil-bafer		

F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)
(*) inbjank veru, bwejra mhux użata
(**) inbjank mhux użat matul l-inkubazzjoni, iżda użat biex tiġi kkonfermata r-radjuattività totali miżjuda.

Tabella 5

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Kurvi Sħaħ ta' Konċentrazzjoni għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u għall-Kontrolli tal-Pjastri.

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
A	TB (Solvent biss)			TB (Solvent biss)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10-3)			TC1 (1×10-4)			TC1 (1×10-5)			TC1 (1×10-6)		
C	TC1 (1×10-7)			TC1 (1×10-8)			TC1 (1×10-9)			TC1 (1×10-10)		
D	TC2 (1×10-3)			TC2 (1×10-4)			TC2 (1×10-5)			TC2 (1×10-6)		
E	TC2 (1×10-7)			TC2 (1×10-8)			TC2 (1×10-9)			TC2 (1×10-10)		
F	TC3 (1×10-3)			TC3 (1×10-4)			TC3 (1×10-5)			TC3 (1×10-6)		
G	TC3 (1×10-7)			TC3 (1×10-8)			TC3 (1×10-9)			TC3 (1×10-10)		
H	NE (IC_{50})			NE (1×10-4,5)			E2 ($IC_{>50}$)			E2 (1×10-7)		

F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)

Tlestija tal-assaġġ tal-irbit kompetittiv

38. Kif muri fit-Tabella 6, għandhom jiżdiedu fil-bwejriet 80 µl tal-kontroll b'solvent, tal-kontroll bil-bafer, tal-estroġenu referenzjarju, tal-legant dgħajjef, tal-mhux legant, u tas-sustanzi kimiċi tat-test imħejjija f'bafer tal-assaġġ. Imbagħad, f'kull bwejra għandha tiżdied soluzzjoni ta' 4 nM [3H]-17β-estradjol. Wara rotazzjoni bil-galbu għal 10 sa 15-il minuta bejn 2° sa 8°C, għandha tiżdied soluzzjoni ta' 40 µl hrERα. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'2° sa 8°C għal 16 sa 20 siegħa u jitqiegħdu fuq rotatur matul il-perjodu ta' inkubazzjoni.

Tabella 6

Volum tal-Komponenti tal-Assaġġ għall-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv tal-hrER, Pjastri għall-Mikrotitraġġ

Volum (µl)	Kostitwent
80	17β-estradjol mhux tikkettat, noretinodrel, OTES, sustanzi kimiċi tat-test, solvent jew bafer
40	soluzzjoni ta' 4 nM [^{3}H]-17β-estradjol
40	soluzzjoni ta' hrERα, konċentrazzjoni kif determinata
160	*Volum totali f'kull bwejra tal-assaġġ*

39. Imbagħad għandha ssir il-kwantifikazzjoni ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα, wara separazzjoni ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα minn [^{3}H]-17β-Estradjol ħieles billi tiżdied sospensjoni ta' 80 µl DCC kiesaħ f'kull bwejra, kif deskritt fil-paragrafi 20-23 għall-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.

40. Il-bwejriet H1-6 (identifikati bħala inbjank (għal dawk jaħarqu) fit-tabella 4) jirrappreżentaw id-dpms tal-estradjol tikkettat [^{3}H] f'40 µl. L-alikwota ta' 40 µl għandha titwassal direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-bwejriet H1 – H6.

Kriterji ta' aċċettabbiltà

Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

41. Il-kurva tal-irbit speċifiku għandha tilħaq plateau hekk kif jintużaw konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [^{3}H]-17β-estradjol, li tindika saturazzjoni tal-hrERα bil-ligand.

42. Il-ligand speċifiku f'1 nM [3H]-17β-estradjol għandu jkun ġewwa l-medda aċċettabbli ta' 15 % sa 25 % tar-radjuattività totali mkejla medja miżjuda fis-sessjonijiet. Ħruġ ħafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata u l-assaġġ tas-saturazzjoni għandu jerġa' jsir.

43. Id-*data* għandha tipproduċi plott Scatchard lineari.

44. L-irbit mhux speċifiku ma għandux ikun eċċessiv. Il-valur għall-irbit mhux speċifiku tipikament għandu jkun ta' <35 % tal-irbit totali. Madankollu, il-proporzjon jista' kultant jaqbeż dan il-limitu meta titkejjel dpm baxxa ħafna għall-anqas konċentrazzjoni ta' 17β-Estradjol radjotikkettat ittestjat.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

45. Konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jispostaw [^{3}H]-17β-estradjol mir-riċettur b'mod konsistenti b'irbit kompetittiv f'sit wieħed.

46. Il-valur tal-IC_{50} għall-estroġenu ta' riferiment (jiġifieri 17β-estradjol) għandu jkun bejn wieħed u ieħor daqs il-konċentrazzjoni molari ta' [^{3}H]-17β-estradjol flimkien ma' Kd determinat mill-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.

47. L-irbit speċifiku totali għandu jkun konsistentement fi ħdan il-medda aċċettabbli ta' 20 ± 5 % meta l-konċentrazzjoni mkejla medja tar-radjuattività totali miżjuda f'kull bwejra tkun ta' 1 nM fis-sessjonijiet. Ħruġ ħafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata.

48. Is-solvent ma għandux ibiddel is-sensittività jew ir-riproduċibbiltà tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bis-solvent (bwejriet tat-TB) jitqabblu mal-kontroll bil-bafer biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ. Ir-riżultati tat-TB u tal-kontroll bil-Bafer għandhom ikunu komparabbli jekk ma jkun hemm ebda effett tas-solvent fuq l-assaġġ.

49. Il-mhux legant ma għandux jisposta aktar minn 25 % tal-[^{3}H]-17β-estradjol mill-hrERα meta jiġi ttestjat sa 10^{-3} M (OTES) jew 10^{-4} M (DBP).

50. Il-kriterji tal-prestazzjoni ġew żviluppati għall-estroġenu ta' referenza u għal żewġ leganti dgħajfin (eż. noretinodrel, noretindron) bl-użu tad-*data* mill-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ FW tal-Irbit tal-hrER (Anness N ta' Riferiment 2). L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti għal (n) +/- SD medja għas-sessjonijiet tal-kontroll kollha bejn il-laboratorji li ħadu sehem fl-istudju ta' validazzjoni. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % ġew ikkalkolati għall-parametri ta' dħul ta' kurva (jiġifieri l-quċċata, il-qiegħ, Hillslope, logIC_{50}) għall-estroġenu referenzjarju u għal-leganti dgħajfin u għal-$\log_{10}$RBA tal-leganti dgħajfin relattivi għall-estroġenu referenzjarju u huma pprovduti bħala kriterji tal-prestazzjoni għall-kontrolli pożittivi. It-Tabella 1 tipprovdi l-meded mistennija għall-parametri ta' dħul ta' kurva li jistgħu jintużaw bħala kriterji tal-prestazzjoni. Fil-prattika, il-medda tal-IC_{50} tista' tvarja ftit fuq il-bażi tal-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u tal-konċentrazzjoni tal-ligand.

51. Ma ġie żviluppat ebda kriterju tal-prestazzjoni għall-parametri ta' dħul ta' kurva għas-sustanzi kimiċi tat-test minħabba l-firxa vasta ta' sustanzi kimiċi tat-test potenzjali eżistenti u l-varjazzjoni fl-affinitajiet u fl-eżiti potenzjali (eż. Kurva sħiħa, kurva parzjali, ebda dħul ta' kurva). Madankollu, għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati minn kull sessjoni għal kull sustanza kimika tat-test. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċċata (eż. 90 - 100 % tal-irbit) tal-kurva kompetittiva. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-3 sessjonijiet mhux konkorrenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-kontrolli minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għandhom joqorbu lejn il-kejlijiet tal-prestazzjoni rrapportati għal dan l-assaġġ FW u jkunu konsistenti mad-*data* storika tal-kontrolli minn kull laboratorju rispettiv.

ANALIŻI TAD-*DATA*

Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

52. Jitkejjel l-irbit totali kif ukoll dak mhux speċifiku. Minn dawn il-valuri, l-irbit speċifiku tal-konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [^{3}H]-17β-estradjol f'kundizzjonijiet ta' ekwilibriju jiġi kkalkolat bit-tnaqqis tal-mhux speċifiku mit-total. Graff tal-irbit speċifiku kontra l-konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol għandha tilħaq plateau għall-irbit speċifiku massimu li tindika saturazzjoni tal-hrERα bl-[^{3}H]-17β-estradjol. Barra minn hekk, l-analiżi tad-*data* għandha tiddokumenta l-irbit ta' [^{3}H]-17β- estradjol ma' sit ta' rbit wieħed b'affinità għolja. L-irbit mhux speċifiku, totali u speċifiku għandu jintwera fuq kurva tal-irbit tas-saturazzjoni. Analiżi ulterjuri ta' din id-*data* għandha tuża analiżi ta' rigressjoni mhux lineari (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) b'wiri finali tad-*data* bħala plot Scatchard.

53. L-analiżi tad-*data* għandha tiddetermina l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit totali biss, bl-użu tas-suppożizzjoni li l-irbit mhux speċifiku hu lineari, sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għall-użu ta' metodu differenti. Barra minn hekk, ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Il-korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. bl-użu tal-metodu ta' Swillens 1995) dejjem għandha tintuża meta jiġu determinati l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

54. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tiġi plottjata bħala irbit speċifiku ta' [^{3}H]-17β-estradjol kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log10) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta' [^{3}H]-17β hi l-valur tal-IC_{50}.

55. Stimi tal-valuri tal-log (IC_{50}) għall-kontrolli pożittivi (eż. estroġenu referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Il-quċċata, il-qiegħ, il-pendil u l-log(IC_{50}) ġeneralment għandhom jitħallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Ma għandhiex tintuża korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tiġi rieżaminata biex jiġi żgurat dħul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef għandha tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC_{50}) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC_{50}) għal 17β-estradjol. Ir-riżultati mill-kontrolli pożittivi u mill-kontroll mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-miżuri tal-prestazzjoni tal-assaġġ fil-paragrafi 45-50 f'dan l-Appendiċi 2.

56. Id-*data* għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tiġi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tiġi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tiġi klassifikata kif suppost. Hu rakkomandat li kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel issirilha analiżi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estroġenu referenzjarju u għall-kontrolli tal-legant dgħajjef (ara l-paragrafu 55 aktar 'il fuq). Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dħul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidħol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv ġenerata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta' tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [^{3}H]-17β-estradjol marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni kimika, u l-konsistenza fil-parametri mdaħħla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analiżijiet tad-*data* saru kif suppost.

Interpretazzjoni tad-*data*

57. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà, sustanza kimika tat-test titqies li tkun legant għall-hrERα jekk kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons fi ħdan il-medda tad-*data* jkun anqas minn 50 % (Figura 1).

58. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li mhix legant għall-hrERα jekk:

— Kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi ħdan il-medda tad-*data* jkun ogħla minn 75 %, jew

— Kurva tal-irbit ma tkunx tista' tiddaħħal u l-anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* jkun ogħla minn 75 %.

59. Is-sustanzi kimiċi tat-test jitqiesu ekwivoċi jekk ma tiġi ssodisfata l-ebda waħda mill-kundizzjonijiet ta' hawn fuq (eż. l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla jkun bejn 76 – 51 %).

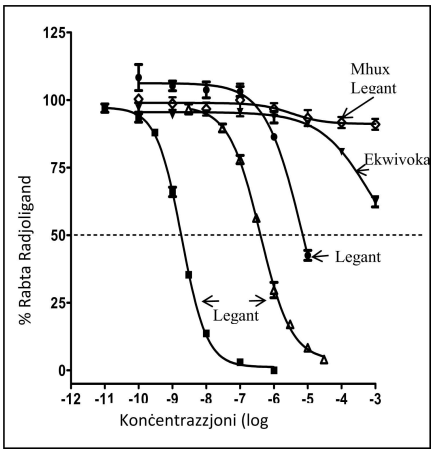
Tabella 7

Kriterji għall-assenjazzjoni tal-klassifikazzjoni fuq il-bażi tal-kurva tal-irbit kompetittiv għal sustanza kimika tat-test.

Klassifikazzjoni	Kriterji
Legant[a]	Kurva tal-irbit tista' tiddaħħal. L-**anqas punt fil-kurva tar-rispons fi ħdan il-medda tad-*data* hu anqas minn 50 %.**
Mhux Legant[b]	Jekk tista' tiddaħħal kurva tal-irbit, l-**anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi ħdan il-medda tad-*data* hu akbar minn 75 %.** Jekk ma tistax tiddaħħal kurva tal-irbit, l-**anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* hu ogħla minn 75 %.**
Ekwivoka[c]	Kwalunkwe sessjoni li tista' tiġi ttestjata la hi legant u lanqas mhux legant (*eż.* L-anqas punt fil-kurva mdaħħla tar-rspons hu bejn 76 – 51 %).

Figura 1

Eżempji ta' klassifikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test bl-użu ta' kurva tal-irbit kompetittiv.



60. Diversi sessjonijiet imwettqa fi ħdan laboratorju għal sustanza kimika tat-test jiġu kombinati bl-assenjazzjoni ta' valuri numeriċi għal kull sessjoni u bit-teħid tal-medja bejn is-sessjonijiet kif muri fit-Tabella 8. Ir-riżultati għas-sessjonijiet kombinati fi ħdan kull laboratorju jitqabblu mal-klassifikazzjoni mistennija għal kull sustanza kimika tat-test.

Tabella 8

Il-metodu għall-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bl-użu ta' diversi sessjonijiet fi ħdan laboratorju

Biex jiġi assenjat valur għal kull sessjoni:	
Klassifikazzjoni	Valur Numeriku
Legant	2
Ekwivoka	1
Mhux legant	0
Biex tiġi klassifikata medja ta' valur numeriku fuq diversi sessjonijiet:	
Klassifikazzjoni	Valur Numeriku
Legant	Medja ≥ 1,5
Ekwivoka	0,5 ≤ Medja < 1,5
Mhux legant	Medja < 0,5

RAPPORT TAT-TEST

61. Ara l-paragrafu 24 ta' "**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**" ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 2.1

LISTA TA' TERMINI

[^{3}H]E2: 17β-Estradjol radjotikkettat bi tritju

DCC: Faħam miksi bid-dekstran

E_2: 17β-estradjol mhux tikkettat (inert)

Bafer tal-assaġġ: 10 mM Tris, 10 mg Albumina tas-Serum tal-Bovini /ml, 2 mM DTT, 10 % gliċerol, 0,2 mM lewpeptina, pH 7,5

hrERα: Riċettur alfa tal-estroġenu rikombinanti uman

Replika: Waħda mid-diversi bwejriet li jkun fihom l-istess kontenut fl-istess konċentrazzjonijiet u li jiġu ttestjati b'mod konkorrenti fi ħdan sessjoni waħda. F'dan il-protokoll, kull konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata fi triplikat; jiġifieri, hemm tliet repliki li jiġu assaġġati fl-istess ħin f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Sessjoni: Sett sħiħ ta' bwejriet ta' assaġġ ta' pjastra għall-mikrotitraġġ f'sessjoni konkorrenti li jipprovdi l-informazzjoni neċessarja kollha biex jiġi karatterizzat l-irbit ta' sustanza kimika tat-test mal-hrERα (viz., it-total [^{3}H]-17β-estradjol miżjud fil-bwejra tal-assaġġ, l-irbit massimu ta' [^{3}H]-17β-estradjol mal-hrERα, l-irbit mhux speċifiku, u l-irbit totali f'diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test). Sessjoni tista' tikkonsisti fi bwejra tal-assaġġ waħda biss (jiġifieri replika) għal kull konċentrazzjoni, iżda peress li dan il-protokoll jeħtieġ assaġġar fi triplikat, sessjoni waħda tikkonsist fi tliet bwejriet tal-assaġġ għal kull konċentrazzjoni. Barra minn hekk, dan il-protokoll jeħtieġ tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri mhux konkorrenti) għal kull sustanza kimika.

Appendiċi 2.2

ASSAĠĠ TIPIKU TAS-SATURAZZJONI TA' [^{3}H]-17B-ESTRADJOL BI TLIET BWEJRIET REPLIKI

Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki											
Pożizzjoni	**Replika**	**Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra**	**Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Jahraq (nM)**	**Volum ta' E2 Jahraq (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Jahraq (nM)**	**Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Kiesaħ (µM)**	**Volum ta' E2 Kiesaħ (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Kiesaħ (µM)**	**Volum tal-Bafer (µl)**	**Volum tar-Riċettur (µl)**	**Volum totali fil-bwejriet**
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki											
Pożizzjoni	**Replika**	**Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra**	**Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Jahraq (nM)**	**Volum ta' E2 Jahraq (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Jahraq (nM)**	**Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Kiesaħ (µM)**	**Volum ta' E2 Kiesaħ (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Kiesaħ (µM)**	**Volum tal-Bafer (µl)**	**Volum tar-Riċettur (µl)**	**Volum totali fil-bwejriet**
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki											
Pożizzjoni	**Replika**	**Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra**	**Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Jahraq (nM)**	**Volum ta' E2 Jahraq (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Jahraq (nM)**	**Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Kiesaħ (µM)**	**Volum ta' E2 Kiesaħ (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Kiesaħ (µM)**	**Volum tal-Bafer (µl)**	**Volum tar-Riċettur (µl)**	**Volum totali fil-bwejriet**
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Jahraq	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Jahraq	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Jahraq	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Jahraq	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Jahraq	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Jahraq	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Jahraq	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Jahraq	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Jahraq	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Jahraq	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Jahraq	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Jahraq	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Jahraq	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Jahraq	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Jahraq	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Jahraq	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Assaġġ Tipiku tas-Saturazzjoni ta' [3H]-17β-Estradjol bi Tliet Bwejriet Repliki											
Pożizzjoni	**Replika**	**Kodiċi tat-Tip ta' Bwejra**	**Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Jaħraq (nM)**	**Volum ta' E2 Jaħraq (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Jaħraq (nM)**	**Konċentrazzjoni Inizjali ta' E2 Kiesaħ (µM)**	**Volum ta' E2 Kiesaħ (µl)**	**Konċentrazzjoni Finali ta' E2 Kiesaħ (µM)**	**Volum tal-Bafer (µl)**	**Volum tar-Riċettur (µl)**	**Volum totali fil-bwejriet**
H5	2	Jaħraq	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Jaħraq	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Jaħraq	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Jaħraq	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Jaħraq	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Jaħraq	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Jaħraq	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Jaħraq	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Kun af li l-bwejriet "jaħarqu" jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-40 µl jiżdiedu biss għall-għadd tax-xintillazzjoni.

Appendiċi 2.3:

TIFSILA TAL-BWEJRIET TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT KOMPETITTIV

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	A1	1	irbit totali	TB	TB1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	irbit totali	TB	TB2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	irbit totali	TB	TB3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	irbit totali	TB	TB4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	irbit totali	TB	TB5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	irbit totali	TB	TB6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	E2 kiesaħ	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	E2 kiesaħ	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	E2 kiesaħ	S	S1	2,00E-07	40	-	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	E2 kiesaħ	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B5	2	E2 kiesaħ	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	E2 kiesaħ	S	S2	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	E2 kiesaħ	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	E2 kiesaħ	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	E2 kiesaħ	S	S3	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	B10	1	E2 kiesaħ	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	E2 kiesaħ	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	E2 kiesaħ	S	S4	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	E2 kiesaħ	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	E2 kiesaħ	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	E2 kiesaħ	S	S5	6,00E-10	40	-	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	E2 kiesaħ	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	E2 kiesaħ	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	E2 kiesaħ	S	S6	2,00E-10	40	-	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	E2 kiesaħ	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	E2 kiesaħ	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C9	3	E2 kiesaħ	S	S7	2,00E-11	40	-	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	inbjank	inbjank	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	inbjank	inbjank	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	inbjank	inbjank	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	noretinodrel	NE	WP1	6,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	noretinodrel	NE	WP2	2,00E-05	40	-	40	80	160	1,0E-05

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	D7	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	noretinodrel	NE	WP3	6,00E-06	40	-	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	noretinodrel	NE	WP4	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E8	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-08	40	-	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	E11	2	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	noretinodrel	NE	WP	6,00E-09	40	-	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	L	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	L	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	L	OTES	2,00E-03	40	-	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	L	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	L	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	L	OTES	2,00E-04	40	-	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	L	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	L	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	L	OTES	2,00E-05	40	-	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	L	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	L	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	L	OTES	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	L	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	L	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	L	OTES	2,00E-07	40	-	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	L	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	L	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G6	3	OTES	L	OTES	2,00E-08	40	-	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	L	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-bwejra	Kodiċi tal-konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jaħraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	G8	2	OTES	L	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	L	OTES	2,00E-09	40	-	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	L	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	L	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	L	OTES	2,00E-10	40	-	40	-	160	1,0E-10
S	H1	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	jaħraq	H	H	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	kontroll bil-bafer	BC	BC	-	40	80	40	-	160	-

Kun af li l-bwejriet "jaħarqu" jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-40 µl jiżdiedu biss għall-għadd tax-xintillazzjoni.

Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µL)	Volum tal-Bafer (µL)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	A1	1	irbit totali	TB	TBB1B1	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	irbit totali	TB	TB2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	irbit totali	TB	TB3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	irbit totali	TB	TB4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	irbit totali	TB	TB5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	irbit totali	TB	TB6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S0	2,00E-06	40	-	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µL)	Volum tal-Bafer (µL)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	C1	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Sustanza Kimika tat-Test 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µL)	Volum tal-Bafer (µL)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	E1	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	6	-	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Sustanza Kimika tat-Test 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

Tifsila tal-Bwejriet tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µL)	Volum tal-Bafer (µL)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	G1	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Sustanza Kimika tat-Test 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noretinodrel	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noretinodrel	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 kiesaħ S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 kiesaħ S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 kiesaħ S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 kiesaħ S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 kiesaħ S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 kiesaħ S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

Appendiċi 3

L-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAR-RIĊETTUR TAL-ESTROĠENU *IN VITRO* BL-UŻU TA' PROTEINA TAD-DOMINJU TAL-IRBIT TAL-LIGAND TAL-ERA RIKOMBINANTI TAL-CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

1. Dan l-assaġġ *in vitro* tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv tar-Riċettur tal-Estroġenu (Erα) juża dominju tal-irbit tal-ligand (LBD) tal-ERα uman (hrERα). Din il-binja tal-proteina ġiet prodotta mill-Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), fil-Ġappun, u teżisti bħala proteina ta' fużjoni ta' glutatjon-S-transferaži (GST), u hi espressa fl-*E. coli*. Il-protokoll CERI għadda minn studju ta' validazzjoni multilaboratorju internazzjonali (2) li wera r-rilevanza u l-affidabbiltà tiegħu għall-iskop maħsub tal-assaġġ.

2. Dan l-assaġġ hu proċedura ta' skrinjar għall-identifikazzjoni ta' sustanzi li jistgħu jorbtu mal-hrERα. Jintuża biex jiddetermina l-ħila ta' sustanza kimika tat-test li tikkompeti ma' 17β-estradjol għall-irbit mal-hrERα-LBD. Ir-riżultati kwantitattivi tal-assaġġ jistgħu jinkludu l-IC_{50} (kejl tal-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test meħtieġa biex jiġi spostat nofs l-[^{3}H]-17β-estradjol mill-hrERα) u l-affinitajiet għall-irbit relattiv tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-hrERα meta mqabbel ma' 17β-estradjol. Għall-finijiet ta' skrinjar tas-sustanzi kimiċi, ir-riżultati kwalitattivi aċċettabbli tal-assaġġ jistgħu jinkludu klassifikazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test bħala leganti tal-hrERα, mhux leganti, jew ekwivoċi fuq il-bażi tal-kriterji deskritti għall-kurvi tal-irbit.

3. L-assaġġ juża ligand radjuattiv li jeħtieġ liċenzja tal-materjali radjuattivi għal-laboratorju. Il-proċeduri kollha b'radjoisotopi u b'sustanzi kimiċi perikolużi għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri deskritti mil-leġiżlazzjoni nazzjonali.

4. Għandhom jinqraw "**INTRODUZZJONI ĠENERALI**" u "**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**" qabel ma dan l-assaġġ jintuża għal finijiet regolatorji. Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet użati f'din it-TG huma deskritti fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJI TAL-ASSAĠĠ (ARA WKOLL INTRODUZZJONI ĠENERALI)

5. L-assaġġ tal-irbit tal-hrERα jkejjel il-ħila ta' ligand radjotikkettat ([^{3}H]17β-estradjol) li jorbot mal-ER fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test (jiġifieri kompetitur). Sustanzi kimiċi tat-test li fihom affinità għolja għall-ER jikkompetu mal-ligand radjotikkettat f'konċentrazzjoni inferjuri meta mqabbla ma' dawk is-sustanzi kimiċi b'affinità inferjuri għar-riċettur.

6. Dan l-assaġġ jikkonsisti f'żewġ komponenti ewlenin: esperiment ta' rbit tas-saturazzjoni biex jiġu karatterizzati l-parametri ta' interazzjoni riċettur-ligand, segwit minn esperiment tal-irbit kompetittiv li jikkaratterizza l-kompetizzjoni bejn sustanza kimika tat-test u ligand radjotikkettat għall-irbit mal-ER.

7. L-iskop tal-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni hu li jikkaratterizza lott partikolari ta' riċetturi għall-affinità u n-numru tal-irbit bi tħejjija għall-esperiment tal-irbit kompetittiv. L-esperiment tal-irbit tas-saturazzjoni jkejjel, taħt kundizzjonijiet ta' ekwilibriju, l-affinità ta' konċentrazzjoni fissa tar-riċettur tal-estroġenu għal-ligand naturali tiegħu (rappreżentat mill-kostanti ta' dissoċjazzjoni, Kd), u l-konċentrazzjoni tas-siti attivi tar-riċettur (Bmax).

8. L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-affinità ta' sustanza biex tikkompeti ma' [^{3}H]17β-estradjol għall-irbit mal-ER. L-affinità hi kwantifikata mill-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li, f'ekwilibriju, tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku tal-[^{3}H]17β-estradjol (imsejħa l-"konċentrazzjoni inibitorja 50 %" jew IC_{50}). Din tista' tiġi evalwata wkoll bl-użu tal-affinità relattiva għall-irbit (RBA, relattiva għall-IC_{50} tal-estradjol imkejla b'mod separat fl-istess sessjoni). L-esperiment tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' [^{3}H]17β-estradjol f'konċentrazzjoni fissa fil-preżenza ta' firxa wiesgħa (tmien ordnijiet ta' kobor) tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad id-*data* tiddaħħal, fejn possibbli, biex tifforma l-ekwazzjoni ta' Hill (Hill, 1910) li tiddeskrivi l-ispostament tar-radjoligand minn legant kompetittiv ta' sit wieħed. Il-firxa tal-ispostament tal-estradjol radjotikkettat fl-ekwilibriju tintuża biex is-sustanza kimika tat-test tiġi karatterizzata bħala legant, mhux legant, jew waħda li tiġġenera rispons ekwivoku.

PROĊEDURA

Wiri ta' Prestazzjoni Aċċettabbli tal-Proteina tal-hrERα

9. Qabel it-twettiq ta' rutina tal-assaġġi tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv, għandu jintwera li kull lott ġdid tal-hrERα jkollu prestazzjoni korretta fil-laboratorju fejn se jintuża. Għandu jintuża proċess imqassam fuq żewġ stadji biex tintwera l-prestazzjoni. Dawn l-istadji huma dawn li ġejjin:

— Agħmel assaġġ tal-irbit ta' [3H]-17β-estradjol tas-saturazzjoni biex turi l-ispeċifiċità u s-saturazzjoni tal-hrERα. Analiżi ta' rigressjoni nonlineari ta' din id-*data* (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) u l-plott Scatchard sussegwenti għandha tiddokumenta l-affinità għall-irbit tal-hrERα ta' [3H]-17β-estradjol (Kd) u n-numru ta' riċetturi (Bmax) għal lott partikolari tal-hrERα.

— Agħmel assaġġ tal-irbit kompetittiv billi tuża s-sustanzi tal-kontroll (estroġenu ta' riferiment (17β-estradjol), legant dgħajjef (eż. noretinodrel jew noretindron), u mhux legant (ottiltrietossisilan, OTES). Kull laboratorju għandu jistabbilixxi bażi ta' *data* storika biex jiddokumenta l-konsistenza tal-IC50 u tal-valuri rilevanti għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef fost l-esperimenti u l-lottijiet differenti tal-hrERα. Barra minn hekk, il-parametri tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għas-sustanzi tal-kontroll għandhom ikunu fi ħdan il-limiti tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (ara t-Tabella 1) li ġew żviluppati bl-użu tad-*data* mil-laboratorji li ħadu sehem fl-istudju ta' validazzjoni għal dan l-assaġġ (2).

Tabella 1

Kriterji tal-prestazzjoni żviluppati għall-estroġenu ta' riferiment u għal-legant dgħajjef, Assaġġ CERI tal-Irbit tal-hrER.

Sustanza	Parametru	Medja [a]	Devjazzjoni Standard(n)	Intervall ta' Kunfidenza ta' 95 % [b]	
				Limitu Inferjuri	Limitu Superjuri
17β-estradjol	Quċċata	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Qiegħ	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	HillSlope	−1,22	0,20 (70)	−1,27	−1,17
	$LogIC_{50}$	−8,93	0,23 (70)	−8,98	−8,87
Noretinodrel	Quċċata	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Qiegħ	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	HillSlope	−1,04	0,21 (68)	−1,09	−0,99
	$LogIC_{50}$	−6,19	0,40 (68)	−6,29	−6,10
Noretindron [c]	Quċċata	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Qiegħ	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Pendil ta' Hill	−1,18	0,32 (23)	−1,31	−1,04
	$LogIC_{50}$	−6,01	0,54 (23)	−6,25	−5,78

[a] Medja ± Devjazzjoni Standard (SD) bid-daqs tal-kampjun (n) ġiet ikkalkolata bl-użu tal-istimi ta' dħul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'erba' laboratorji matul l-istudju ta' validazzjoni (ara l-Anness N tar-referenza 2).

[b] L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti bħala gwida għall-kriterji ta' aċċettabbiltà.

[c] L-ittestjar tan-noretindron kien fakultattiv għas-Subkompitu matul l-istudju ta' validazzjoni (ara r-Referenza 2, ara s-Subkompitu 4). B'hekk, ± SD (n) medji ġew ikkalkolati bl-użu tal-istimi ta' dħul ta' kurva (ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri) għas-sessjonijiet ta' kontroll imwettqa f'żewġ laboratorji.
Il-medda għall-IC_{50} se tkun dipendenti fuq il-Kd tal-preparazzjoni tar-riċettur u l-konċentrazzjoni tal-ligand radjotikkettat użati fi ħdan kull laboratorju. Ikun aċċettabbli aġġustament xieraq għall-medda tal-IC_{50} fuq il-bażi tal-kundizzjonijiet użati għat-twettiq tal-assaġġ.

Wiri tal-profiċjenza tal-laboratorju

10. Ara l-paragrafi 17 u 18 u t-Tabella 2 f'"**KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER**" ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Kull assaġġ (irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv) għandu jikkonsisti fi tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri b'dilwizzjonijiet friski ta' riċettur, ta' sustanzi kimiċi, u ta' reaġenti) f'jiem differenti, u kull sessjoni għandu jkun fiha tliet repliki.

Determinazzjoni tal-Konċentrazzjoni tar-Riċettur (hrERα)

11. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv tvarja ftit skont il-lott u l-kundizzjonijiet tal-ħżin. Għalhekk, għandha tiġi determinata l-konċentrazzjoni tar-riċettur attiv kif riċevuta mingħand il-fornitur. Din trendi l-konċentrazzjoni xierqa tar-riċettur attiv fil-ħin tas-sessjoni.

12. Skont il-kundizzjonijiet li jikkorrispondu għall-irbit kompetittiv (jiġifieri 0,5 nM [^{3}H]-estradjol), konċentrazzjonijiet nominali ta' riċettur ta' 0,1, ta' 0,2, ta' 0,4, u ta' 0,6 nM għandhom jiġu inkubati fl-assenza (irbit totali) u fil-preżenza (irbit mhux speċifiku ta' 1 μM estradjol mhux tikkettat. L-irbit speċifiku, ikkalkolat bħala d-differenza tal-irbit totali u mhux speċifiku, jiġi plottjat kontra l-konċentrazzjoni nominali tar-riċettur. Il-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti valuri tal-irbit speċifiċi li jikkorrispondu għal 40 % tar-radjotikketta miżjuda hi relatata mal-konċentrazzjoni korrispondenti tar-riċettur, u din il-konċentrazzjoni tar-riċettur għandha tintuża għall-esperimenti tal-irbit tas-saturazzjoni u kompetittiv. Spiss, konċentrazzjoni finali tal-hrER ta' 0,2 nM se tkun konformi ma' din il-kundizzjoni.

13. Jekk il-kriterju ta' 40 % ma jkunx jista' jiġi ssodisfat ripetutament, il-kompożizzjoni tal-esperiment għandha tiġi verifikata għal żbalji potenzjali. Nuqqas ta' lħuq tal-kriterju ta' 40 % jista' jindika li ftit li xejn ikun hemm riċettur attiv fil-lott rikombinanti, u mbagħad ikollu jiġi kkunsidrat l-użu ta' lott ieħor ta' riċettur.

Assaġġ tas-saturazzjoni

14. Tmien konċentrazzjonijiet li jiżdiedu dejjem aktar ta' [^{3}H]17β-estradjol għandhom jiġu evalwati fi triplikat, skont it-tliet kundizzjonijiet li ġejjin (ara t-Tabella 2):

a. Fin-nuqqas ta' 17β-estradjol mhux tikkettat u l-preżenza ta' ER. Din hi d-determinazzjoni tal-irbit totali skont il-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet li jkollhom [^{3}H]17β-estradjol biss.

b. Fil-preżenza ta' konċentrazzjoni eċċessiva għal 2000 darba ta' 17β-estradjol mhux tikkettat fuq 17β-estradjol tikkettat u fil-preżenza tal-ER. L-intenzjoni ta' din il-kundizzjoni hi li tissatura s-siti attivi tal-irbit b'17β-estradjol mhux tikkettat, u bil-kejl tar-radjuattività fil-bwejriet, tiddetermina l-irbit mhux speċifiku. Kwalunkwe estradjol jaħraq li jifdal li jista' jorbot mar-riċettur jitqies li jkun jorbot ma' sit mhux speċifiku peress li l-estradjol kiesaħ għandu jkun f'konċentrazzjoni għolja tant li jintrabat mas-siti speċifiċi disponibbli kollha fuq ir-riċettur.

c. Fin-nuqqas ta' 17β-estradjol mhux tikkettat u l-assenza tal-ER (determinazzjoni tar-radjuattività totali)

Preparazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettati u tal-hrERα

15. Soluzzjoni ta' 40 nM ta' [^{3}H]-17β-estradjol għandha titħejja minn soluzzjoni ewlenija ta' 1 μM ta' [^{3}H]-17β-estradjol fid-DMSO billi jiżdiedu DMSO (biex jitħejjew 200 nM) u bafer tal-assaġġ f'temperatura ambjentali (biex jitħejjew 40 nM). Bl-użu ta' din is-soluzzjoni ta' 40 nM, titħejja s-sensiela ta' dilwizzjonijiet ta' [^{3}H]-17β-estradjol, li jvarjaw minn 0,313 nM sa 40 nM b'bafer tal-assaġġ f'temperatura ambjenatli (kif rappreżentata fil-linja 12 tat-Tabella 2). Il-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ, li jvarjaw minn 0,0313 sa 4,0 nM jinkisbu billi jiżdiedu 10 μl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra (ara t-Tabelli 2 u 3), Il-preparazzjoni tal-bafer tal-assaġġ, il-kalkolu tas-soluzzjoni ewlenija oriġinali ta' [^{3}H]-17β-estradjol fuq il-bażi tal-attività speċifika tagħha, il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet huma deskritti fid-dettall fil-protokoll CERI (2).

16. Id-dilwizzjonijiet ta' soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jitħejjew minn soluzzjoni ewlenija ta' 1 nM 17β-estradjol billi jiżdied bafer tal-assaġġ biex jinkisbu tmien konċentrazzjonijiet waħda akbar mill-oħra li inizjalment ivarjaw bejn 0,625 μM u 80 μM, Il-konċentrazzjonijiet finali tal-assaġġ, li jvarjaw minn 0,0625 sa 8 μM jinkisbu billi jiżdiedu 10 μl ta' dawn is-soluzzjonijiet fil-bwejriet tal-assaġġ rispettivi ta' pjastra għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra dedikata għall-kejl tal-irbit mhux speċifiku (ara t-Tabelli 2 u 3), Il-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat hi deskritta fid-dettall fil-protokoll CERI (2).

17. Għandha tintuża l-konċentrazzjoni tar-riċettur li tagħti l-irbit speċifiku ta' 40±10 % (ara l-paragrafi 12-13). Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha titħejja b'bafer tal-assaġġ kiesaħ silġ eżatt qabel l-użu, jiġifieri wara li jkunu thejjew il-bwejriet kollha għall-irbit totali, għall-irbit mhux speċifiku u għal-ligand jaħraq waħdu.

18. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra jitħejjew kif muri fit-Tabella 2, bi 3 repliki għal kull konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol. Assenjament tal-volum ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' 17β-estradjol mhux tikkettat, tal-bafer u tar-riċettur hu pprovdut fit-Tabella 3.

Tabella 2

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit tas-Saturazzjoni

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (*)	12 (*)
	Għall-kejl tat-TB			Għall-kejl tal-NSB			Għad-determinazzjoni tal-ligand jaħraq waħdu				Dilwizzjonijiet tal-E2 mhux tikkettati għall-kolonni 4-6 tal-pjastri	Dilwizzjonijiet ta' [3H]E2 għall-kolonni 1-9 tal-pjastri
A	0,0313 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E_2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB: irbit totali,
NSB: irbit mhux speċifiku
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-estradjol
E2: 17β-estradjol mhux tikkettat
(*) Il-konċentrazzjonijiet indikati hawn huma l-konċentrazzjonijiet finali f'kull bwejra.
(*) Id-dilwizzjonijiet ta' E2 u ta' [^{3}H]E2 mhux tikkettati jistgħu jithejjew fi pjastra differenti.

Tabella 3

Volumi tar-Reaġent għall-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tas-Saturazzjoni

Numru tal-Linja		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Stadji tal-Preparazzjoni		Bwejriet tat-TB			Bwejriet tal-NSB			Ligand Jaħraq Waħdu		
Volum tal-komponenti għall-bwejriet ta' reazzjoni ta' fuq u l-ordni għaż-żieda	Bafer	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 mhux tikkettat mil-linja 11 fit-Tabella2	-			10 µl			-		
	[3H]E2 mil-linja12 fit-Tabella2	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Volum ta' reazzjoni totali		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubazzjoni		**WARA REAZZJONI TA' INKUBAZZJONI TA' SAGĦTEJN (2)**						Kwantifikazzjoni tar-radjuattività eżatt wara l-preparazzjoni. Ebda inkubazzjoni		
Trattament b'0,4 % DCC		**Iva**			**Iva**			**Nru**		
Volum ta' 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtrazzjoni		Iva			Iva			Nru		
KEJL TAD-DPMS										
Volum tal-kwantifikazzjoni miżjud mat-taħlita ta' xintillazzjoni		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Jekk tintuża LSC għall-mikropjastri għall-kejl tad-dpms, it-thejjija tal-ligand jaħraq waħdu fl-istess pjastra tal-assaġġ tal-bwejriet tat-TB u tal-NSB ma tkunx adattata. Il-ligand jaħraq waħdu ma għandux jitħejja fi pjastra differenti.

(**) Jekk tintuża ċ-ċentrifugrazzjoni għas-separazzjoni tad-DCC, il-50 µl tas-supernatant għandhom jitkejlu bl-LSC biex tiġi evitata kontaminazzjoni tad-DCC.

19. Pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għad-determinazzjoni tal-irbit totali u tal-irbit mhux speċifiku għandhom jiġu inkubati f'temperatura ambjentali (22°C sa 28°C) għal sagħtejn.

Kejl ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα

20. Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni ta' saġħtejn, [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα għandu jiġi separat minn [^{3}H]-17β-Estradjol ħieles billi tiżdied sospensjoni ta' 100µl 0,4 % DCC kiesaħ silġ fil-bwejriet. Imbagħad il-pjastri għandhom jitqiegħdu fuq is-silġ għal 10 minuti u t-taħlita ta' reazzjoni u s-sospensjoni ta' DCC għandhom jiġu ffiltrati, bi trasferiment f'filtru tal-pjastri għall-mikrotitraġġ, biex jitneħħa d-DCC. Imbagħad għandhom jiżdiedu 100 µl tal-filtrat mal-fluwidu ta' xintillazzjoni fil-kunjetti tal-LSC għad-determinazzjoni tad-disintegrazzjoni fil-minuta (dpms) għal kull kunjett bl-għadd tax-xintillazzjoni tal-likwidi.

21. Inkella, jekk ma jkunx hemm filtru tal-mikropjastri disponibbli, it-tneħħija tad-DCC tista' tinkiseb b'ċentrifugrazzjoni. Imbagħad 50 µl supernatant li fih [^{3}H]-17β-estradjol marbut mal-hrERα għandu jittieħed b'attenzjoni estrema, biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni tal-bwejriet bil-mess tad-DCC, u għandu jintuża għall-għadd tax-xintillazzjoni.

22. Il-kundizzjoni tal-ligand jaħraq waħdu tintuża għad-determinazzjoni tad-diżintegrazzjoni fil-minuta (dpm) ta' [^{3}H]-17β-estradjol miżjud fil-bwejriet tal-assaġġ. Ir-radjuattività għandha tiġi kwantifikata eżatt wara l-preparazzjoni. Dawn il-bwejriet ma għandhomx jiġu inkubati u ma għandhomx jiġu ttrattati b'sospensjoni tad-DCC iżda l-kontenut tagħhom għandu jitwassal direttament fil-fluwidu tax-xintillazzjoni. Dawn il-miżuri juru kemm [^{3}H]-17β-estradjol f'dpms żdied ma' kull sett ta' bwejriet għall-irbit totali u għall-irbit mhux speċifiku.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

23. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv ikejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [^{3}H]-17β- estradjol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Għandhom jintużaw tliet repliki konkorrenti f'kull konċentrazzjoni fi ħdan sessjoni waħda. Barra minn hekk, għandhom isiru tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għal kull sustanza kimika ttestjata. L-assaġġ għandu jsir fi pjastra waħda jew aktar għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra.

Kontrolli

24. Meta jsir l-assaġġ, is-solvent u l-kontrolli konkorrenti (jiġifieri l-estroġenu referenzjarju, il-legant dgħajjef, u dak mhux legant) għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment. Kurvi sħaħ ta' konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontrolli ta' riferiment (jiġifieri legant dgħajjef u mhux legant) għandhom jintużaw fi pjastra waħda matul kull sessjoni. Il-pjastri l-oħra kollha għandu jkun fihom (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu, jiġifieri bejn wieħed u ieħor spostament sħiħ tal-ligand radjotikkettat) u medja (bejn wieħed u ieħor l-IC_{50}) ta' E2 u ta' legant dgħajjef fi triplikat; (ii) kontroll b'solvent u irbit mhux speċifiku, kull wieħed fi triplikat. Il-proċeduri għat-tħejjija tal-bafer tal-assaġġ, ta' [^{3}H]-17β-estradjol, ta' hrERα u tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma deskritti fil-fond fil-protokoll CERI (2).

Kontrolli tas-solvent:

25. Il-kontroll b'solvent jindika li s-solvent ma jinteraġixxix mas-sistema tat-test u jkejjel ukoll l-irbit totali (TB). DMSO hu s-solvent preferut. Inkella, jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fid-DMSO, jista' jintuża l-etanol. Il-konċentrazzjoni tad-DMSO fil-bwejriet tal-assaġġ finali għandha tkun ta' 2,05 % u tista' tiżdied sa 2,5 % fil-każ ta' nuqqas ta' solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test. Konċentrazzjonijiet ta' DMSO ogħla minn 2,5 % ma għandhomx jintużaw minħabba l-interferenza ta' konċentrazzjonijiet ogħla tas-solvent mal-assaġġ. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jkunux solubbli fid-DMSO, iżda solubbli fl-etanol, jista' jintuża massimu ta' 2 % etanol fl-assaġġ mingħajr interferenza.

Kontroll bil-bafer:

26. Il-kontroll bil-bafer (BC) la għandu jkun fih solvent u lanqas is-sustanza kimika tat-test, iżda għandu jkun fih il-komponenti l-oħra kollha tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bil-bafer jitqabblu mal-kontroll b'solvent biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ.

Legant b'saħħtu (estroġenu ta' riferiment)

27. 17β-estradjol (CAS 50-28-2) hu l-ligand endoġenu u jorbot b'affinità għolja mal-ER, subtip tal-alfa. Kurva standard li tuża 17β-estradjol mhux tikkettat għandha titħejja għal kull assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrERα, biex tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien fi ħdan l-istess laboratorju. Tmien soluzzjonijiet ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jithejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejriet tal-assaġġ li għandhom jintużaw għall-kurva standard imqassma kif ġej: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. L–ogħla konċentrazzjoni ta' 17β–estradjol (1 μM) mhux tikkettat għandha sservi bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku. Din il-konċentrazzjoni hi distinta bit-tikketta "NSB" fit-Tabella 4 għalkemm hi wkoll parti mill-kurva standard.

Legant dgħajjef

28. Legant dgħajjef (noretinodrel (CAS68-23-5), jew inkella, noretindron (CAS 68-22-4)) għandu jkun inkluż biex tintwera s-sensittività ta' kull esperiment u tkun tista' ssir valutazzjoni tal-varjabbiltà meta jsir l-assaġġ maż-żmien. Tmien soluzzjonijiet tal-legant dgħajjef għandhom jitħejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejriet tal-assaġġ kif ġej: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} u 10^{-9} M.

Mhux legant

29. L-ottitrietossisilan (OTES, CAS 2943-75-1) għandu jintuża bħala l-kontroll negattiv (mhux legant). Dan jipprovdi garanzija li l-assaġġ kif imwettaq isib sustanzi kimiċi tat-test li ma jorbtux mal-hrERα. Tmien soluzzjonijiet tal-mhux legant għandhom jitħejjew fid-DMSO u f'bafer tal-assaġġ, b'konċentrazzjonijiet finali fil-bwejriet tal-assaġġ kif ġej: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Il–ftalat tad–di–n–butil (DBP, CAS 84-72-2) jista' jintuża bħala mhux legant alternattiv, iżda jiġi ttestjat sa 10^{-4}M biss. Is-solubbiltà massima ta' DBP fl-assaġġ intweriet li hi 10^{-4}M.

Konċentrazzjoni tal-hrERα

30. Għandu jintuża l-ammont tar-riċettur li jagħti l-irbit speċifiku ta' 40±10 % (ara l-paragrafi 12-13 tal-Appendiċi 3). Is-soluzzjoni ta' hrERα għandha titħejja b'dilwizzjoni tal-hrERα funzjonali f'bafer tal-assaġġ kiesaħ silġ, eżatt qabel l-użu.

[^{3}H]-17β-estradjol

31. Il-konċentrazzjoni finali ta' [^{3}H]-17β-estradjol fil-bwejriet tal-assaġġ għandha tkun ta' 0,5 nM.

Sustanzi Kimiċi tat-Test

32. L-ewwel nett, hemm bżonn li jsir test tas-solubbiltà biex jiġi determinat il-limitu tas-solubbiltà għal kull sustanza kimika tat-test u biex tiġi identifikata l-medda ta' konċentrazzjoni xierqa li għandha tintuża meta jsir il-protokoll tat-test. Il-limitu tas-solubbiltà ta' kull sustanza kimika tat-test għandu jiġi determinat inizjalment fis-solvent u mbagħad jiġi kkonfermat b'mod ulterjuri fil-kundizzjonijiet tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni finali ttestjata fl-assaġġ ma għandhiex taqbeż il-1mM. L-ittestjar għas-sejbien tal-medda jinkludi kontroll b'solvent flimkien ma' tal-anqas tmien dilwizzjonijiet serjali tal-log, li jibdew bil-konċentrazzjoni massima aċċettabbli (eż. 1 mM jew anqas, fuq il-bażi tal-limitu tas-solubbiltà), u l-preżenza ta' dardir jew ta' preċipitat innotat (ara wkoll il-paragrafu 35 tal-Appendiċi 3). Ladarba tiġi determinata l-medda ta' konċentrazzjonijiet, sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata bl-użu ta' tmien konċentrazzjonijiet tal-log spazjati kif xieraq kif definit fit-test preċedenti tas-sejbien tal-medda. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati fit-tieni u fit-tielet esperimenti għandhom jiġu aġġustati ulterjorment kif xieraq biex tiġi karatterizzata aħjar il-kurva konċentrazzjoni rispons, jekk ikun hemm bżonn.

33. Id-dilwizzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jitħejjew fis-solvent xieraq (ara l-paragrafu 25 tal-Appendiċi 3). Jekk l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fid-DMSO jew fl-etanol, u ż-żieda ta' aktar solvent tkun tirriżulta f'konċentrazzjoni tas-solvent ogħla mil-limitu aċċettabbli fit-tubu finali, l-ogħla konċentrazzjoni tista' titnaqqas għall-anqas konċentrazzjoni li jmiss. F'dan il-każ, konċentrazzjoni addizzjonali tista' tiżdied fil-limitu inferjuri tas-serje ta' konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet oħra fis-serje għandhom jibqgħu l-istess.

34. Is-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ssorveljati bir-reqqa meta jiżdiedu mal-bwejra tal-assaġġ, peress li s-sustanza kimika tat-test tista' tfur barra maż-żieda fil-bwejra tal-assaġġ. Id-*data* għall-bwejriet kollha li fihom il-preċipitat għandha tkun esklużа mid-dħul ta' kurva, u r-raġuni għall-esklużjoni tad-*data* għandha tiġi nnotata.

35. Jekk hemm informazzjoni eżistenti preċedenti minn sorsi oħra li jipprovdu log(IC_{50}) ta' sustanza kimika tat-test, jista' jkun xieraq li d-dilwizzjonijiet jitqassmu ġeometrikament aktar qrib tal-log(IC_{50}) mistenni (jiġifieri 0,5 unitajiet tal-log). Ir-riżultati finali għandhom juru biżżejjed tifrix tal-konċentrazzjonijiet fuq iż-żewġ naħat tal-log(IC50), inklużi l-"quċċata" u l-"qiegħ", b'tali mod li l-kurva tal-irbit tkun tista' tiġi karatterizzata b'mod adegwat.

Organizzazzjoni tal-pjastra tal-assaġġ

36. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tikkettatti għandhom jitħejjew bl-użu ta' inkubazzjonijiet sestupli għall-kontroll b'solvent, bl-ogħla konċentrazzjoni tal-estroġenu referenzjarju (E2) li sservi wkoll bħala l-indikatur tal-irbit mhux speċifiku (NSB), bil-kontroll b'bafer, u inkubazzjonijiet triplikati għal kull waħda mit-tmien konċentrazzjonijiet tal-kontroll li ma jorbotx (ottiltrietossisilan), bis-seba' konċentrazzjonijiet inferjuri għall-estroġenu referenzjarju (E2), bit-tmien konċentrazzjonijiet tal-legant dgħajjef (noretinodrel jew noretindron), u bit-tmien konċentrazzjonijiet ta' kull sustanza kimika tat-test (TC). Tifsila indikattiva tad-dijagramma tat-tifsila tal-pjastra għall-kurvi sħaħ tal-konċentrazzjoni għall-estroġenu u għall-kontrolli referenzjarji hi mogħtija hawn taħt fit-Tabella 4. Jintużaw pjastri addizzjonali għall-mikrotitraġġ għas-sustanza kimika tat-test u dawn għandu jkun fihom kontrolli tal-pjastra (jiġifieri (i) konċentrazzjoni għolja (spostament massimu) u medja (madwar l-IC_{50}) ta' E2 u legant dgħajjef fi triplikat; ii) kontroll b'solvent (bħala rbit totali) u irbit mhux speċifiku, kull wieħed f'sestuplu (Tabella 5). Eżempju ta' worksheet tat-tifsila tal-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ kompetittiv bl-użu ta' tliet sustanzi kimiċi tat-test mhux magħrufa hu pprovdut fl-Appendiċi 3.3. Il-konċentrazzjonijiet indikati fil-worksheet kif ukoll fit-Tabelli 4 u 5 jirreferu għall-konċentrazzjonijiet finali użati f'kull bwejra tal-assaġġ. Il-konċentrazzjoni massima għall-E2 għandha tkun ta' 1×10^{-7} M u għal-legant dgħajjef għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni użata għal-legant dgħajjef fil-pjastra 1. Il-konċentrazzjoni tal-IC_{50} trid tiġi determinata mil-laboratorju fuq il-bażi tal-bażi ta' *data* tal-kontroll storiku tiegħu. L-aspettattia hi li dan il-valur ikun simili għal dak osservat fl-istudji ta' validazzjoni (ara t-tabella 1).

Tabella 4

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Kurvi Sħaħ ta' Konċentrazzjoni għal Estroġenu u għal Kontrolli Referenzjarji (Pjastra 1)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Kontroll bil-Bafer u Kontroll Pożittiv (E2)			Pożittiv Dgħajjef (Noretinodrel)			Kontroll Negattiv (OTES)			TB u NSB		
A	Inbjank (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (kontroll b'solvent) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Kontroll bil–bafer		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Inbjank (għal dak jaħraq) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Kampjun stabbilit għall-pjastra għall-mikrotitraġġ tal-istandards li għandu jitħaddem ma' kull esperiment.
([2]) Kun af li din il-pjastra għall-mikrotitraġġ issir bl-użu tad-dilwizzjonijiet magħmula fil-pjastra tad-dilwizzjoni deskritta għall-istandards fit-taqsimiet preċedenti.
F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)
(*) inbjank veru, bwejra mhux użata
(**) inbjank mhux użat matul l-inkubazzjoni, iżda użat biex tiġi kkonfermata r-radjuattività totali miżjuda.

Tabella 5

Tifsila tal-Pjastra għall-Mikrotitraġġ tal-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv, Pjastri Addizzjonali għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test (TC) u għall-Kontrolli tal-Pjastri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Sustanza Kimika tat-Test-1 (TC-1)			Sustanza Kimika tat-Test-2 (TC-2)			Sustanza Kimika tat-Test-3 (TC-3)			Kontrolli		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7}M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E_2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10_{-4,5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (Kontroll b'solvent)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

F'dan l-eżempju, il-legant dgħajjef hu noretinodrel (NE)

Tlestija tal-assaġġ tal-irbit kompetittiv

37. Bwejriet tal-eċċezzjonar għall-irbit totali u inbjanki (għall-jaħarqu), kif murija fit-Tabella 6, 50 µl tal-bafer tal-assaġġ għandhom jitqiegħdu f'kull bwejra, u għandhom jitħalltu ma' 10 µl kontroll b'solvent, estroġenu referenzjarju (E2), legant dgħajjef, mhux legant, u sustanzi kimiċi tat-test, rispettivament, 10 µl ta' soluzzjoni ta' 5 nM [3H]-17β-estradjol. Imbagħad, soluzzjoni ta' 30µl riċettur kiesaħ silġ iddaħħlet f'kull pjastra u thalltet bil-galbu. Is-soluzzjoni tal-hrERα għandha tkun l-aħħar reaġent miżjud. Il-pjastri għall-mikrotitraġġ tal-assaġġ għandhom jiġu inkubati f'temperatura ambjentali (22° sa 28°C) għal sagħtejn (2).

Tabella 6

Volum tal-Komponenti tal-Assaġġ għall-Assaġġ tal-Irbit Kompetittiv tal-hrER, Pjastri għall-Mikrotitraġġ

Stadji tal-Preparazzjoni		Għajr bwejriet tat-TB	Bwejriet tat-TB	Inbjank (għal dak jaħraq)
Volum tal-komponenti għall-bwejriet ta' reazzjoni ta' fuq u l-ordni għaż-żieda	Bafer tal-assaġġ f'Temperatura Ambjentali	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 mhux tikkettat, legant dgħajjef, mhux legant, solvent u sustanzi kimiċi tat-test (*)	10 µl	-	-
	[3H]-17β-estradjol għall-kisba tal-konċentrazzjoni finali ta' 0,5 nM (jiġifieri 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	konċentrazzjoni tal-rERα kif determinata (ara l-paragrafi 12-13)	30 µl	30 µl	-
Volum totali f'kull bwejra tal-assaġġ		100 µl	100 µl	100 µl

(*) imħejjija kif xieraq biex tinkiseb konċentrazzjoni finali fi ħdan il-konċentrazzjoni aċċettabbli tas-solvent

38. Imbagħad għandha ssir il-kwantifikazzjoni ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα, wara separazzjoni ta' [^{3}H]-17β-Estradjol marbut mal-hrERα minn [^{3}H]-17β-Estradjol ħieles billi tiżdied sospensjoni ta' 100 µl DCC kiesaħ silġ f'kull bwejra, kif deskritt fil-paragrafi 21-23 tal-Appendiċi 3 għall-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.

39. Il-bwejriet G10-12 u H10-12 (identifikati bħala inbjank (għal dawk jaħarqu) fit-Tabella 4) jirrappreżentaw id-dpms tal-estradjol tikkettat [^{3}H] f'10 µl. L-alikwota ta' 10 µl għandha titwassal direttament fil-fluwidu ta' xintillazzjoni.

Kriterji ta' aċċettabbiltà

Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

40. Il-kurva tal-irbit speċifiku għandha tilħaq plateau hekk kif jintużaw konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [^{3}H]-17β-estradjol, li tindika saturazzjoni tal-hrERα bil-ligand.

41. Il-ligand speċifiku f'0,5 nM [^{3}H]-17β-estradjol għandu jkun ġewwa l-medda aċċettabbli ta' 30 % sa 50 % tar-radju-attività totali mkejla medja miżjuda fis-sessjonijiet. Ħruġ ħafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata u l-assaġġ tas-saturazzjoni għandu jerġa' jsir.

42. Id-*data* għandha tipproduċi plott Scatchard lineari.

43. L-irbit mhux speċifiku ma għandux ikun eċċessiv. Il-valur għall-irbit mhux speċifiku tipikament għandu jkun ta' <35 % tal-irbit totali. Madankollu, il-proporzjon jista' kultant jaqbeż dan il-limitu meta titkejjel dpm baxxa ħafna għall-anqas konċentrazzjoni ta' 17β-estradjol radjotikkettat ittestjat.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

44. Konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' 17β-estradjol mhux tikkettat għandhom jispostaw [^{3}H]-17β-estradjol mir-riċettur b'mod konsistenti b'irbit kompetittiv f'sit wieħed.

45. Il-valur tal-IC_{50} għall-estroġenu ta' riferiment (jiġifieri 17β-estradjol) għandu jkun bejn wieħed u ieħor daqs il-konċentrazzjoni molari ta' [^{3}H]-17β-estradjol flimkien ma' Kd determinat mill-assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni.

46. L-irbit speċifiku totali għandu jkun konsistentement fi ħdan il-medda aċċettabbli ta' 40 ± 10 % meta l-konċentrazz-joni mkejla medja tar-radjuattività totali miżjuda f'kull bwejra tkun ta' 0,5 nM fis-sessjonijiet. Ħruġ ħafif okkażjonali barra minn din il-medda hu aċċettabbli, iżda jekk is-sessjonijiet ikunu konsistentement barra din il-medda jew medda partikolari tkun ferm barra din il-medda, il-konċentrazzjoni tal-proteina għandha tiġi aġġustata.

47. Is-solvent ma għandux ibiddel is-sensittività jew ir-riproduċibbiltà tal-assaġġ. Ir-riżultati tal-kontroll bis-solvent (bwej-riet tat-TB) jitqabblu mal-kontroll bil-bafer biex jiġi verifikat li s-solvent użat ma jaffettwax is-sistema tal-assaġġ. Ir-riżultati tat-TB u tal-kontroll bil-Bafer għandhom ikunu komparabbli jekk ma jkun hemm ebda effett tas-solvent fuq l-assaġġ.

48. Il-mhux legant ma għandux jisposta aktar minn 25 % tal-[^{3}H]-17β-estradjol mill-hrERα meta jiġi ttestjat sa 10^{-3} M (OTES) jew 10^{-4} M (DBP).

49. Il-kriterji tal-prestazzjoni ġew żviluppati għall-estroġenu ta' referenza u għal żewġ leganti dgħajfin (eż. noretinodrel, noretindron) bl-użu tad-*data* mill-istudju ta' validazzjoni għall-Assaġġ CERI tal-Irbit tal-hrER (Anness N ta' riferiment 2). L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma pprovduti għal ± SD (n) tas-sessjonijiet tal-kontroll kollha bejn erba' laboratorji li ħadu sehem fl-istudju ta' validazzjoni. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % ġew ikkalkolati għall-parametri ta' dħul ta' kurva (jiġifieri l-quċċata, il-qiegħ, Hillslope u Log IC_{50}) għall-estroġenu referenzjarju u għal-leganti dgħajfin, għal-Log_{10}RBA tal-leganti dgħajfin relattivi għall-estroġenu referenzjarju. It-Tabella 1 tipprovdi l-meded mistennija għall-parametri ta' dħul ta' kurva li jistgħu jintużaw bħala kriterji tal-prestazzjoni. Fil-prattika, il-medda tal-IC_{50} tista' tvarja ftit fuq il-bażi tal-Kd derivat minn esperimenti tal-preparazzjoni tar-riċettur u tal-konċentrazzjoni tal-ligand użati għall-assaġġ.

50. Ma ġie żviluppat ebda kriterju tal-prestazzjoni għall-parametri ta' dħul ta' kurva għas-sustanzi kimiċi tat-test minħabba l-firxa vasta ta' sustanzi kimiċi tat-test potenzjali eżistenti u l-varjazzjoni fl-affinitajiet u fl-eżiti potenzjali (eż. Kurva shiha, kurva parzjali, ebda dħul ta' kurva). Madankollu, għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati minn kull sessjoni għal kull sustanza kimika tat-test. Medda suffiċjenti ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandha tintuża biex tiġi definita biċ-ċar il-quċċata (eż. 90 - 100 % tal-irbit) tal-kurva kompetittiva. Il-varjabbiltà bejn ir-repliki f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll bejn it-tliet sessjonijiet mhux konkorrenti għandha tkun raġonevoli u xjentifikament difendibbli. Il-kontrolli minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għandhom joqorbu lejn il-kejlijiet tal-prestazzjoni rrapportati għal dan l-assaġġ CERI u jkunu konsistenti mad-*data* storika tal-kontrolli minn kull laboratorju rispettiv.

ANALIŻI TAD-*DATA*

Assaġġ tal-irbit tas-saturazzjoni

51. Jitkejjel l-irbit totali kif ukoll dak mhux speċifiku. Minn dawn il-valuri, l-irbit speċifiku tal-konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' [^{3}H]-17β-estradjol f'kundizzjonijiet ta' ekwilibriju jiġi kkalkolat bit-tnaqqis tal-mhux speċifiku mit-total. Graff tal-irbit speċifiku kontra l-konċentrazzjoni ta' [^{3}H]-17β-estradjol għandha tilħaq plateau għall-irbit speċifiku massimu li tindika saturazzjoni tal-hrERα bl-[^{3}H]-17β-estradjol. Barra minn hekk, l-analiżi tad-*data* għandha tiddokumenta l-irbit ta' [^{3}H]-17β- estradjol ma' sit ta' rbit wieħed b'affinità għolja. L-irbit mhux speċifiku, totali u speċifiku għandu jintwera fuq kurva tal-irbit tas-saturazzjoni. Analiżi ulterjuri ta' din id-*data* għandha tuża analiżi ta' rigressjoni mhux lineari (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) b'wiri finali tad-*data* bħala plot Scatchard.

52. L-analiżi tad-*data* għandha tiddetermina l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit totali biss, bl-użu tas-suppożizzjoni li l-irbit mhux speċifiku hu lineari, sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għall-użu ta' metodu differenti. Barra minn hekk, ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Il-korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand (eż. bl-użu tal-metodu ta' Swillens 1995) dejjem għandha tintuża meta jiġu determinati l-Bmax u l-Kd mid-*data* dwar l-irbit tas-saturazzjoni.

Assaġġ tal-irbit kompetittiv

53. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tiġi plottjata bħala irbit speċifiku ta' [^{3}H]-17β-estradjol kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log10) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta' [^{3}H]-17β hi l-valur tal-IC_{50}.

54. Stimi tal-valuri tal-log (IC_{50}) għall-kontrolli pożittivi (eż. estroġenu referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Il-quċċata, il-qiegħ, il-pendil u l-log(IC_{50}) ġeneralment għandhom jitħallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Ma għandhiex tintuża korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tiġi rieżaminata biex jiġi żgurat dħul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef għandha tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC_{50}) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC_{50}) għal 17β-estradjol. Ir-riżultati mill-kontrolli pożittivi u mill-kontroll mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-miżuri tal-prestazzjoni tal-assaġġ fil-paragrafi 44-49 ta' dan l-Appendiċi 3.

55. Id-*data* għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tiġi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tiġi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tiġi klassifikata kif suppost. Hu rakkomandat li kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel issirilha analiżi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estroġenu referenzjarju u għall-kontrolli tal-legant dgħajjef (ara l-paragrafu 54 ta' dan l-Appendiċi 3). Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dħul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidħol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv ġenerata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta' tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [^{3}H]-17β-estradjol marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, u l-konsistenza fil-parametri mdaħħla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analiżijiet tad-*data* saru kif suppost.

Interpretazzjoni tad-*data*

56. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà, sustanza kimika tat-test titqies li tkun legant għall-hrERα jekk kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons fi ħdan il-medda tad-*data* jkun anqas minn 50 % (Figura 1).

57. Dment li ma jiġux issodisfati l-kriterji ta' aċċettabbiltà kollha, sustanza kimika tat-test titqies li mhix legant għall-hrERα jekk:

— Kurva tal-irbit tkun tista' tiddaħħal u l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi ħdan il-medda tad-*data* jkun ogħla minn 75 %, jew

— Kurva tal-irbit ma tkunx tista' tiddaħħal u l-anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* jkun ogħla minn 75 %.

58. Is-sustanzi kimiċi tat-test jitqiesu ekwivoċi jekk ma tiġi ssodisfata l-ebda waħda mill-kundizzjonijiet ta' hawn fuq (eż. l-anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla jkun bejn 76 – 51 %).

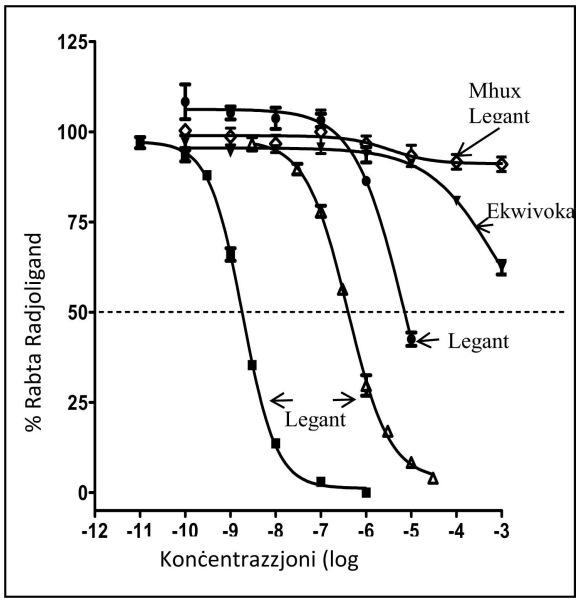
Tabella 7

Kriterji għall-assenjazzjoni tal-klassifikazzjoni fuq il-bażi tal-kurva tal-irbit kompetittiv għal sustanza kimika tat-test.

Klassifikazzjoni	Kriterji
Legant[a]	Kurva tal-irbit tista' tiddaħħal. L-**anqas punt fil-kurva tar-rispons fi ħdan il-medda tad-*data* hu anqas minn 50 %.**
Mhux Legant[b]	Jekk tista' tiddaħħal kurva tal-irbit, l-**anqas punt fil-kurva tar-rispons imdaħħla fi ħdan il-medda tad-*data* hu akbar minn 75 %.** Jekk ma tistax tiddaħħal kurva tal-irbit, l-**anqas irbit perċentwali medju mhux illixxat fost il-gruppi ta' konċentrazzjoni fid-*data* hu ogħla minn 75 %.**
Ekwivoċi[c]	Kwalunkwe sessjoni li tista' tiġi ttestjata la hi legant u lanqas mhux legant (*eż.* L-anqas punt fil-kurva mdaħħla tar-rspons hu bejn 76 – 51 %).

Figura 1

Eżempji ta' klassifikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test bl-użu ta' kurva tal-irbit kompetittiv.



59. Diversi sessjonijiet imwettqa fi ħdan laboratorju għal sustanza kimika tat-test jiġu kombinati bl-assenjazzjoni ta' valuri numeriċi għal kull sessjoni u bit-teħid tal-medja bejn is-sessjonijiet kif muri fit-Tabella 8. Ir-riżultati għas-sessjonijiet kombinati fi ħdan kull laboratorju jitqabblu mal-klassifikazzjoni mistennija għal kull sustanza kimika tat-test.

Tabella 8

Il-metodu għall-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bl-użu ta' diversi sessjonijiet fi ħdan laboratorju

Biex jiġi assenjat valur għal kull sessjoni:	
Klassifikazzjoni	**Valur Numeriku**
Legant	2
Ekwivoċi	1
Mhux legant	0
Biex tiġi klassifikata medja ta' valur numeriku fuq diversi sessjonijiet:	
Klassifikazzjoni	**Valur Numeriku**
Legant	Medja ≥ 1,5
Ekwivoċi	0,5 ≤ Medja < 1,5
Mhux legant	Medja < 0,5

RAPPORT TAT-TEST

60. Ara l-paragrafu 24 ta' "KOMPONENTI TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT TAL-hrER" ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Appendiċi 3.1

LISTA TA' TERMINI

[^{3}H]E2: 17β-Estradjol radjotikkettat bi tritju

DCC: Faħam miksi bid-dekstran

E_2: 17β-estradjol mhux tikkettat (inert)

Bafer tal-assaġġ: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, li fih 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO3, 10 % Gliċerol, 0,2 mM Lewpeptina, 1 mM Ditjotreitol u 10 mg/ml Albumina tas-Serum tal-Bovini

hrERα: Riċettur alfa tal-estroġenu rikombinanti uman (dominju li jorbot tal-ligand)

Replika: Waħda mid-diversi bwejriet li jkun fihom l-istess kontenut fl-istess konċentrazzjonijiet u li jiġu ttestjati b'mod konkorrenti fi ħdan sessjoni waħda. F'dan il-protokoll, kull konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata fi triplikat; jiġifieri, hemm tliet repliki li jiġu assaġġati fl-istess ħin f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Sessjoni: Sett sħiħ ta' bwejriet ta' assaġġ ta' pjastra għall-mikrotitraġġ f'sessjoni konkorrenti li jipprovdi l-informazzjoni neċessarja kollha biex jiġi karatterizzat l-irbit ta' sustanza kimika tat-test mal-hrERα (viz., it-total [^{3}H]-17β-estradjol miżjud fil-bwejra tal-assaġġ, l-irbit massimu ta' [^{3}H]-17β-estradjol mal-hrERα, l-irbit mhux speċifiku, u l-irbit totali f'diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test). Sessjoni tista' tikkonsisti fi bwejra tal-assaġġ waħda biss (jiġifieri replika) għal kull konċentrazzjoni, iżda peress li dan il-protokoll jeħtieġ assaġġar fi triplikat, sessjoni waħda tikkonsist fi tliet bwejriet tal-assaġġ għal kull konċentrazzjoni. Barra minn hekk, dan il-protokoll jeħtieġ tliet sessjonijiet indipendenti (jiġifieri mhux konkorrenti) għal kull sustanza kimika.

Appendiċi 3.2

TIFSILA TAL-BWEJRIET TAL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT KOMPETITTIV

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	A1	1	Inbjank	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Inbjank	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Inbjank	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 kiesaħ	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	E2 kiesaħ	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	E2 kiesaħ	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	E2 kiesaħ	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	E2 kiesaħ	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	E2 kiesaħ	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	E2 kiesaħ	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	E2 kiesaħ	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	D3	3	E2 kiesaħ	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	E2 kiesaħ	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	E2 kiesaħ	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	E2 kiesaħ	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	E2 kiesaħ	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	E2 kiesaħ	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	E2 kiesaħ	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	E2 kiesaħ	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G2	2	E2 kiesaħ	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	E2 kiesaħ	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	E2 kiesaħ	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	E2 kiesaħ	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	E2 kiesaħ	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	A4	1	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	noretinodrel	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	noretinodrel	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	noretinodrel	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	noretinodrel	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	E5	2	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	noretinodrel	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	F4	1	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	noretinodrel	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	noretinodrel	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	noretinodrel	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	L	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	A8	2	OTES	L	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	L	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	L	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	L	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	L	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	L	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	L	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	L	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	L	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	L	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	L	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	L	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	L	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	E9	3	OTES	L	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F7	1	OTES	L	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	L	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	L	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	L	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	L	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	L	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	L	OTES8D-BP7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	L	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	L	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	irbit totali	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	irbit totali	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	irbit totali	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	irbit totali	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	B11	5	irbit totali	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	irbit totali	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D12	6	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Kontroll bil-bafer	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Kontroll bil—bafer	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Kontroll bil—bafer	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Kontroll bil—bafer	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Kontroll bil—bafer	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Kontroll bil—bafer	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Inbjank (għal dak jahraq)	Jaħraq	H1	—	90	—	10	—	100	—

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jaħraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
S	G11 (*)	2	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħ-raq	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħ-raq	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħ-raq	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħ-raq	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Inbjank (għal dak jaħraq)	Jaħ-raq	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Mhux magħruf 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Mhux magħruf 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Mhux magħruf 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Mhux magħruf 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Mhux magħruf 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Mhux magħruf 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Mhux magħruf 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Mhux magħruf 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Mhux magħruf 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	D1	1	Mhux magħruf 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Mhux magħruf 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Mhux magħruf 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Mhux magħruf 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Mhux magħruf 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Mhux magħruf 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Mhux magħruf 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Mhux magħruf 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Mhux magħruf 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Mhux magħruf 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Mhux magħruf 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Mhux magħruf 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Mhux magħruf 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Mhux magħruf 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	H3	3	Mhux magħruf 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Mhux magħruf 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Mhux magħruf 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Mhux magħruf 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Mhux magħruf 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Mhux magħruf 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Mhux magħruf 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Mhux magħruf 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Mhux magħruf 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Mhux magħruf 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Mhux magħruf 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Mhux magħruf 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Mhux magħruf 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Mhux magħruf 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	E5	2	Mhux magħruf 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Mhux magħruf 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Mhux magħruf 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Mhux magħruf 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Mhux magħruf 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Mhux magħruf 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Mhux magħruf 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Mhux magħruf 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Mhux magħruf 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Mhux magħruf 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Mhux magħruf 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Mhux magħruf 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Mhux magħruf 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A9	3	Mhux magħruf 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	B7	1	Mhux magħruf 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Mhux magħruf 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Mhux magħruf 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Mhux magħruf 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Mhux magħruf 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Mhux magħruf 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Mhux magħruf 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Mhux magħruf 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Mhux magħruf 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Mhux magħruf 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Mhux magħruf 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Mhux magħruf 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Mhux magħruf 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Mhux magħruf 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	F9	3	Mhux magħruf 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Mhux magħruf 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Mhux magħruf 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Mhux magħruf 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Mhux magħruf 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Mhux magħruf 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Mhux magħruf 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	E2 tal-Kontroll (mass)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	E2 tal-Kontroll (mass)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	E2 tal-Kontroll (mass)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	E2 tal-Kontroll (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B11	2	E2 tal-Kontroll (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	E2 tal-Kontroll (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x-10	30	50	10	10	100	E2IC50

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jahraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	C10	1	NE tal-Kontroll (mass)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	NE tal-Kontroll (mass)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	NE tal-Kontroll (mass)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	NE tal-Kontroll (IC50)	S	NEIC501	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	NE tal-Kontroll (IC50)	S	NEIC502	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	NE tal-Kontroll (IC50)	S	NEIC503	NEIC50 x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	E2 kiesaħ (għoli)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

Pjastra	Pożizzjoni	Replika	Tip ta' bwejra	Kodiċi tal-Bwejra	Kodiċi tal-Konċentrazzjoni	Konċentrazzjoni Inizjali tal-Kompetitur (M)	Stokk tal-hrER (µl)	Volum tal-Bafer (µl)	Volum tat-Traċċatur (E2 Jaħraq) (µL)	Volum mill-pjastra tad-dilwizzjoni (µL)	Volum Finali (µl)	Konċentrazzjoni Finali tal-Kompetitur (M)
P1	G10	1	irbit totali	TB	TB1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	irbit totali	TB	TB2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	irbit totali	TB	TB3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	irbit totali	TB	TB4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	irbit totali	TB	TB5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	irbit totali	TB	TB6	-	30	60	10	-	100	-

(*) Kun af li l-bwejriet "jaħarqu" jkunu vojta matul l-inkubazzjoni. L-10 µl jiżdiedu biss għall-għadd tax-xintillazzjoni.

Appendiċi 4

KUNSIDERAZZJONIJIET GĦALL-ANALIŻI TAD-*DATA* MILL-ASSAĠĠ TAL-IRBIT KOMPETITTIV TAL-HRER

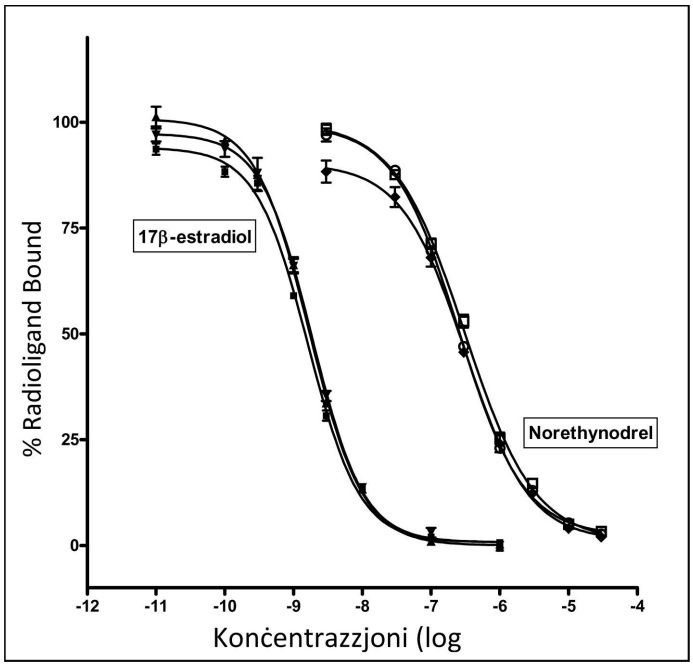
1. L-assaġġ tal-irbit kompetittiv tal-hrERα jkejjel l-irbit ta' konċentrazzjoni waħda ta' [^{3}H]-17β- estradjol fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet dejjem akbar ta' sustanza kimika tat-test. Il-kurva tal-irbit kompetittiv tiġi plottjata bħala irbit speċifiku ta' [^{3}H]-17β-estradjol kontra l-konċentrazzjoni (unitajiet tal-log10) tal-kompetitur. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi 50 % tal-irbit speċifiku massimu ta' [^{3}H]-17β hi l-IC_{50}.

Analiżi tad-*Data* għall-Estroġenu Referenzjarju u għal-Legant Dgħajjef (1)

2. Id-*data* mis-sessjonijiet tal-kontroll huma trasferomati (jiġifieri l-irbit speċifiku perċentwali ta' [^{3}H]-17β-estradjol u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tal-kontroll) għall-analiżi ulterjuri. Stimi tal-valuri tal-log (IC_{50}) għall-kontrolli pożittivi (eż. estroġenu referenzjarju u legant dgħajjef) għandhom jiġu determinati bl-użu ta' softwer xieraq ta' dħul ta' kurva nonlineari għad-dħul f'ekwazzjoni ta' Hill b'erba' parametri (eż. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Il-quċċata, il-qiegħ, il-pendil u l-log(IC50) tipikament jistgħu jitħallew mhux ristretti meta jiddaħħlu dawn il-kurvi. Ir-rigressjoni robusta għandha tintuża meta jiġi determinat l-aħjar dħul sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni. Il-metodu magħżul għar-rigressjoni robusta għandu jiġi ddikjarat. Korrezzjoni għat-tnaqqis tal-ligand ma kinitx meħtieġa għall-assaġġi tal-hrER FW jew CERI, iżda tista' tiġi kkunsidrata jekk tkun meħtieġa. Wara l-analiżi inizjali, kull kurva tal-irbit għandha tiġi rieżaminata biex jiġi żgurat dħul xieraq fil-mudell. L-affinità relattiva għall-irbit (RBA) għal-legant dgħajjef tista' tiġi kkalkolata bħala perċentwal tal-log (IC_{50}) għal-legant dgħajjef relattiv għal-log (IC_{50}) għal 17β-estradjol. Ir-riżultati għall-kontrolli pożittivi u għall-kontroll tal-mhux legant għandhom jiġu evalwati bl-użu tal-kejlijiet tal-prestazzjoni tal-assaġġ u tal-kriterji ta' aċċettabbiltà kif deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar (paragrafu 20), fl-Appendiċi 2 (Assaġġ FW, paragrafi 41-51) u fl-Apendiċi 3 (Assaġġ CERI, paragrafi 41-51). Eżempji ta' tliet sessjonijiet għall-estroġenu referenzjarju u għal-legant dgħajjef huma murija fil-Figura 1.

Figura 1

Eżempji tal-kurvi tal-irbit kompetittiv għall-estroġenu referenzjarju u għal-legant dgħajjef tal-kontroll.



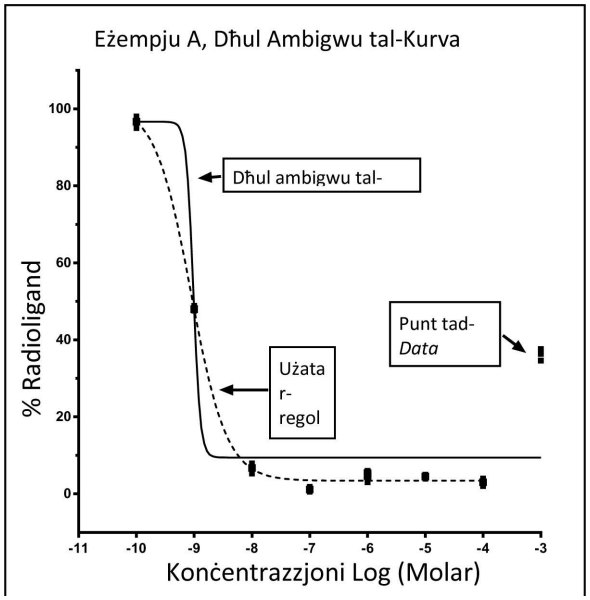
Analiżi tad-*Data* għas-Sustanzi Kimiċi tat-Test

3. Id-*data* għas-sustanzi kimiċi tat-test kollha għandha tiġi analizzata bl-użu ta' approċċ skont l-istadju biex jiġi żgurat li d-*data* tiġi analizzata kif xieraq u li kull kurva tal-irbit kompetittiv tiġi klassifikata kif suppost. Kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test għall-ewwel għandha ssirilha analiżi tad-*data* standardizzata li tkun identika għal dik użata għall-estroġenu referenzjarju u għall-kontrolli tal-legant dgħajjef. Ladarba titlesta, għandhom isiru rieżami tekniku tal-parametri ta' dħul tal-kurva kif ukoll rieżami viżwali ta' kemm qed tidħol sew id-*data* fil-kurva tal-irbit kompetittiv ġenerata għal kull sessjoni. Matul dan ir-rieżami tekniku, l-osservazzjonijiet ta' tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni fil-perċentwal ta' [^{3}H]-17β-estradjol marbut b'mod speċifiku, varjabbiltà baxxa fost ir-repliki tekniċi f'kull konċentrazzjoni kimika, u l-konsistenza fil-parametri mdaħħla fost it-tliet sessjonijiet huma indikazzjoni tajba li l-assaġġ u l-analiżijiet tad-*data* saru kif suppost. Għandu jiġi applikat ġudizzju professjonali meta jiġu rieżaminati r-riżultati minn kull sessjoni għal sustanza kimika tat-test, u d-*data* użata biex kull sustanza kimika tat-test tiġi klassifikata bħala legant jew mhux legant għandha tkun xjentifikament difendibbli.

4. Kultant jista' jkun hemm eżempji ta' *data* li teħtieġ attenzjoni addizzjonali biex tkun tista' tiġi analizzata u interpretata kif xieraq id-*data* dwar l-irbit tal-hrER. Studji fil-passat kienu urew każijiet li fihom l-analiżi u l-interpretazzjoni tad-*data* dwar l-irbit tar-riċettur kompetittiv jistgħu jkunu kumplikati minħabba rpiljar tal-irbit speċifiku perċentwali meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi fl-ogħla konċentrazzjonijiet (Figura 2). Din hi problema magħrufa sew li nstabet meta ntużaw protokolli għal numru ta' assaġġi tal-irbit tar-riċettur kompetittiv (3). F'dawn il-każijiet, jiġi osservat rispons dipendenti fuq il-konċentrazzjoni f'konċentrazzjonijiet inferjuri, iżda hekk kif il-konċentrazzjoni tal-approċċi tas-sustanza kimika tat-test toqrob lejn il-limitu tas-solubbiltà, l-ispostament ta' [^{3}H]17β-estradjol ma jkomplix jonqos. F'dawn il-każijiet, id-*data* għall-konċentrazzjonijiet ogħla tindika li ntlaħaq il-limitu bijoloġiku tal-assaġġ. Pereżempju, dan il-fenomenu ħafna drabi jiġi assoċjati mal-insolubbiltà kimika u mal-preċipitazzjoni f'konċentrazzjonijiet għoljin, jew jista' jkun ukoll riflessjoni ta' qbiż tal-kapaċità tal-faħam miksi bid-dekstran biex jinqabad il-ligand radjotikkettat mhux marbut matul il-proċedura ta' separazzjoni fl-ogħla konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika. L-inklużjoni ta' dawn il-punti tad-*data* meta tiddaħħal id-*data* dwar l-irbit kompetittiv f'kurva sigmojde kultant tista' twassal għal klassifikazzjoni ħażina tal-potenzjal ta' rbit tal-ER għal sustanza kimika tat-test (Figura 2). Biex dan jiġi evitat, il-protokoll għall-assaġġi tal-irbit tal-hrER FW u CERI jinkludi għażla li mill-analiżijiet jiġu eskluži punti tad-*data* fejn il-medja tar-repliki għall-irbit speċifiku perċentwali ta' [^{3}H]17β-estradjol tkun 10 % jew aktar ogħla mill-medja osservata f'konċentrazzjoni inferjuri (jiġifieri dik li komunement tissejjaħ ir-regola tal-10 %). Din ir-regola tista' tintuża darba biss għal kurva partikolari, u jrid ikun jifdal *data* għal tal-anqas sitt konċentrazzjonijiet b'tali mod li tkun tista' tiġi klassifikata kif suppost il-kurva.

Figura 2

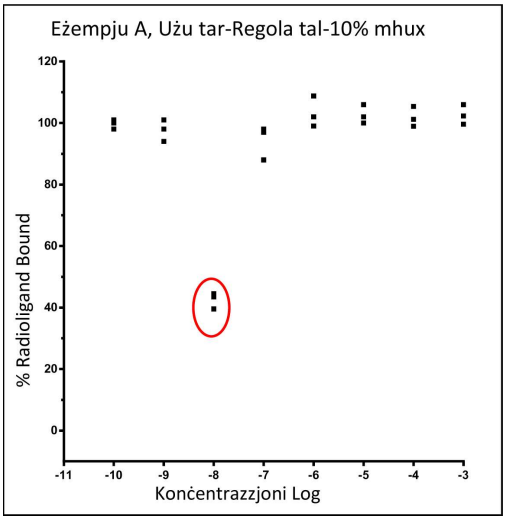
Eżempji, Kurvi tal-Irbit Kompetittiv bl-Użu tar-Regola tal-10 % u mingħajr.

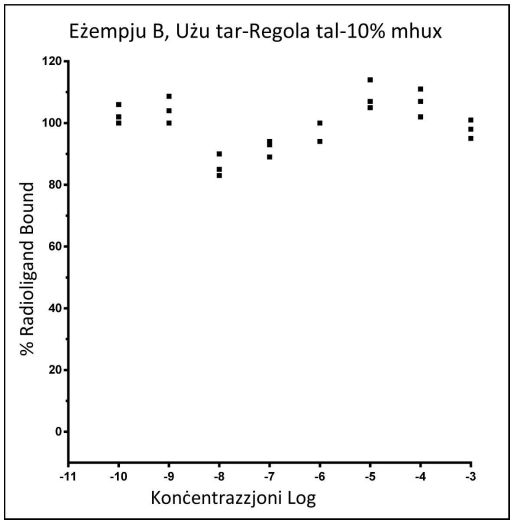


5. L-użu xieraq tar-regola tal-10 % għall-korrezzjoni ta' dawn il-kurvi għandu jiġi kkunsidrat bil-galbu u riżervat għal dawk il-każijiet li fihom ikun hemm indikazzjoni b'saħħitha ta' legant tal-hrER. Matul it-twettiq tal-esperimenti għall-istudju ta' validazzjoni tal-Assaġġ tal-Irbit tal-hrER FW, ġie osservat li r-regola tal-10 % kultant kellha konsegwenza mhux intenzjonata u imprevista. Is-sustanzi kimiċi li ma interaġixxux mar-riċettur (jiġifieri mhux leganti veri) spiss urew varjabbiltà madwar l-irbit tar-radjoligandi ta' 100 % li kienet aktar minn 10 % fil-medda ta' konċentrazzjonijiet ittestjati. Jekk l-anqas valur inzerta kien f'konċentrazzjoni baxxa, id-*data* mill-konċentrazzjonijiet ogħla kollha potenzjalment setgħet titħassar mill-analiżi bl-użu tar-regola tal-10 %, għalkemm dawk il-konċentrazzjonijiet jistgħu jkunu siewja fl-istabbiliment tal-fatt li s-sustanza kimika mhix legant. Il-Figura 3 turi eżempji li fihom l-użu tar-regola tal-10 % ma tkunx adattata.

Figura 3

Eżempji, *Data* dwar l-Irbit Kompetittiv Fejn l-Użu tar-Regola tal-10 % Ma Jkunx Adattat.





REFERENZI

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) Motulsky H. u Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

B.71 **ASSAĠĠI *IN VITRO* DWAR IS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA LI JINDIRIZZA L-AVVENIMENT EWLIENI FL-ATTIVAZZJONI TAĊ-ĊELLOLI DENDRITIĊI FUQ IL-PERKORS TAL-EŻITU AVVERS (AOP) GĦAS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA**

INTRODUZZJONI ĠENERALI

Attivazzjoni tal-metodu ta' ttestjar ibbażat fuq l-avveniment ewlieni taċ-ċelloli dendritiċi

1. Sentizzatur tal-ġilda jirreferi għal sustanza li se twassal għal rispons allerġiku wara kuntatt mal-ġilda kif definit mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) ([1]). Hemm qbil ġenerali dwar l-avvenimenti bijoloġiċi ewlenin li jwasslu għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-għarfien kurrenti dwar il-mekkaniżmi kimiċi u bijoloġiċi assoċjati mas-sensitizzazzjoni tal-ġilda nġabar fil-qosor bħala Perkors tal-Eżitu Avvers (AOP) skont il-programm tal-OECD dwar l-AOP (2), li jibda bl-avveniment ta' tnedija molekulari permezz, l-avvenimenti intermedji sal-effett avvers, jiġifieri dermatite ta' kuntatt allerġiku. F'dan il-każ, l-avveniment ta' tnedija molekulari (jiġifieri l-ewwel avveniment ewlieni) hu l-irbit kovalenti tas-sustanzi elettrofiliċi maċ-ċentri nukleofiliċi fil-proteini tal-ġilda. It-tieni avveniment ewlieni f'dan l-AOP iseħħ fil-keratinoċiti u jinkludi risponsi infjammatorji kif ukoll tibdiliet fl-espressjoni tal-ġeni assoċjati mal-pekorsi tas-sinjalar taċ-ċelloli speċifiċi bħall-perkorsi dipendenti fuq l-element ta' rispons tal-antiossidanti/elettrofili (ARE). It-tielet avveniment ewlieni hu l-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi (DC), tipikament ivvalutata bl-espressjoni ta' markaturi tal-wiċċ taċ-ċelloli, ta' kemikini u ta' ċitokini speċifiċi. Ir-raba' avveniment ewlieni hu l-attivazzjoni u l-proliferazzjoni taċ-ċelloli-T, li hu vvalutat b'mod indirett fl-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali (LLNA) (3).

2. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 442E tal-OECD (2017). Dan jiddeskrivi l-assaġġi *in vitro* li jindirizzaw il-mekkaniżmi deskritti taħt l-avveniment ewlieni fl-attivazzjoni taċ-ċelloli dendritiċi tal-AOP għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (2). It-TM jinkludi testijiet li għandhom jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u dawk li mhumiex sensitizzaturi skont il-GHS tan-NU u s-CLP.

   It-testijiet deskritti f'dan it-TM huma:

   — It-Test tal-Attivazzjoni tal-Linji ta' Ċelloli Umani (h-CLAT)

   — It-Test ta' attivazzjoni tal-linja ta' ċelloli U937 (U-SENS™)

   — L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Interlewkin-8 (assaġġ IL-8 Luc)

3. It-testijiet inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar u fit-TG korrispondenti tal-OECD jistgħu jvarjaw b'rabta mal-proċedura użata biex jiġu ġenerati d-*data* u r-riżultati mkejla iżda jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-riżultati tat-testijiet dwar l-Avveniment Ewlieni fuq l-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi tal-AOP għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda filwaqt li jittieħed benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD.

([1]) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006, ĠU L 353/1, 31.12.2008

Sfond u prinċipji tat-testijiet inklużi fil-metodu ta' ttestjar ibbażat fuq l-avvenimenti ewlenin

4. Normalment, il-valutazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju. Il-metodi klassiċi li jużaw fniek tal-indi, it-Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek tal-Indi (GMPT) ta' Magnusson u ta' Kligman u t-Test Buehler (TM B.6) (4), jistudjaw kemm il-fażi ta' induzzjoni kif ukoll il-fażi ta' eliċitazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. It-testijiet murini, l-LLNA (TM B.42) (3) u ż-żewġ modifiki mhux radjoattivi tiegħu, LLNA: DA (TM B.50) (5) u LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), ilkoll jivvalutaw ir-rispons tal-induzzjoni b'mod esklużiv, u ġew aċċettati wkoll peress li jagħtu vantaġġ fuq it-testijiet fuq il-ħnieżer tal-indi f'termini tat-trattament xieraq tal-annimali flimkien ma' kejl oġġettiv tal-fażi ta' induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

5. Dan l-aħħar ġew adottati metodi ta' ttestjar *in chemico* u *in vitro* b'bażi mekkanistika li jindirizzaw l-ewwel avveniment ewlieni (TM B.59; l-Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi (7)), u t-tieni avveniment ewlieni (TM B.60; Metodu ta' Ttestjar tal-Luċiferaži ARE-Nrf2 (8)) tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda għall-kontribuzzjoni għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' periklu tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi.

6. Testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar jew jikkwantifikaw it-tibdil fl-espressjoni tal-markatur(i) tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjat mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u d-DC wara l-esponiment għas-sensitizzaturi (eż. CD54, CD86) jew it-tibdiliet fl-espressjoni ta' IL-8, ċitokina assoċjata mal-attivazzjoni tad-DC. Is-sensitizzaturi tal-ġilda ġew irrapportati li jinduċu l-espressjoni ta' markaturi tal-membrana taċ-ċelloli bħal CD40, CD54, CD80, CD83, u CD86 minbarra l-induzzjoni ta' ċitokini proinfjammatorji, bħal IL-1β u TNF-α, u diversi kemokini li jinkludu IL-8 (CXCL8) u CCL3 (9) (10) (11) (12), assoċjati mal-attivazzjoni tad-DC (2).

7. Madankollu, peress li l-attivazzjoni tad-DC tirrappreżenta biss avveniment ewlieni wieħed tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (2) (13), l-informazzjoni ġenerata bit-testijiet li jkejlu l-markaturi tal-attivazzjoni tad-DC waħedha jaf ma tkunx biżżejjed biex tinħareġ konklużjoni dwar il-preżenza jew l-assenza tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Għaldaqstant, id-*data* ġenerata bit-testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar hi proposta biex issostni d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) u dawk li mhumiex sensitizzaturi meta jintużaw fi ħdan Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA), flimkien ma' informazzjoni komplimentari rilevanti oħra, eż. derivata minn assaġġi *in vitro* li jindirizzaw avvenimenti ewlenin oħra tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kif ukoll metodi mhux tal-ittestjar, li jinkludu read-across minn analogi kimiċi (13). Eżempji tal-użu tad-*data* ġenerata b'dawn it-testijiet fi ħdan l-Approċċi Definiti, jiġifieir approċċi standardizzati kemm b'rabta mas-sett ta' sorsi ta' informazzjoni użati kif ukoll fil-proċedura applikata għad-*data* biex jinkiseb it-tbassir, ġew ippubblikati (13) u jistgħu jitħaddmu bħala elementi siewja fi ħdan IATA.

8. It-testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar ma jistgħux jintużaw waħedhom, u lanqas biex jissubkategorizzaw is-sensitizzaturi tal-ġilda fis-subkategoriji 1A u 1B kif definiti mill-GHS/mis-CLP tan-NU, għall-awtoritajiet li jimplimentaw dawn iż-żewġ subkategoriji fakultattivi, u lanqas biex titbassar il-potenza għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjonijiet tas-sikurezza. Madankollu, skont il-qafas regolatorju, riżultati pożittivi ġenerati b'dawn il-metodi jistgħu jintużaw waħedhom biex jikklassifikaw sustanza kimika fil-kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.

9. It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat ([96]) u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tat-testijiet għall-ittestjar ta' sustanzi monokostitwenti, ta' sustanzi multikostitwenti u/jew ta' taħlitiet. Bħalissa hemm disponibbli informazzjoni limitata dwar l-applikabbiltà tat-testijiet għal sustanzi/taħlitiet multikostitwenti (14) (15). It-testijiet xorta waħda huma teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti u taħlitiet. Madankollu, qabel ma jintuża dan il-metodu ta' ttestjar fuq taħlita għall-ġenerazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex ([97]). Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-taħlita. Barra minn hekk, meta jiġu ttestjati sustanzi multikostitwenti jew taħlitiet, għandha tingħata kunsiderazzjoni lill-interferenza possibbli tal-kostitwenti ċitotissiċi bir-risponsi osservati.

([96]) F'Ġunju 2013, il-Laqgħa Konġunta tal-OECD qablet li, fejn possibbli, għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu "sustanza kimika tat-test" li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f'linji gwida tat-test ġodda u aġġornati tal-OECD.

([97]) Din is-sentenza ġiet proposta u maqbula fil-laqgħa ta' April 2014 tad-WNT.

DOKUMENTAZZJONI

(1) In-Nazzjonijiet Uniti (2015) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness: L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali.

(4) Il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda.

(5) Il-Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda. L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali. DA.

(6) Il-Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda. L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali. BrdU-ELISA.

(7) Il-Kapitolu B.59 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda In Chemico: Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi (DPRA).

(8) Il-Kapitolu B.60 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Luċiferaży ARE-Nrf2.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, u Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, u Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, u Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Anness 1 u Anness 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Appendiċi 1

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: IT-TEST TAL-ATTIVAZZJONI TAL-LINJI TA' ĊELLOLI UMANI (H-CLAT)

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. L-h-CLAT jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjati mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u taċ-ċelloli dendritiċi (DC) (jiġifieri CD86 u CD54), fil-linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana THP-1, wara esponiment għas-sensitizzaturi (1)(2). Il-livelli ta' espressjoni mkejla tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 u tas-CD54 imbagħad jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.

2. L-h-CLAT ġie evalwat fi studju ta' validazzjoni koordinat mil-Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Annimali (EURL ECAAM) u f'rieżami bejn il-pari indipendenti sussegwenti mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-EURL ECVAM (ESAC). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, l-h-CLAT kien rakkomandat mill-EURL ECVAM (3) biex jintuża bħala parti minn IATA b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini tal-klassifikazzjoni u tat-tikkettar tal-perikli. Eżempji tal-użu tad-*data* tal-h-CLAT flimkien ma' informazzjoni oħra huma rrapportati fid-dokumentazzjoni (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

3. L-h-CLAT wera li kien trasferibbli għal-laboratorji esperjenzati f'tekniki tal-koltura taċ-ċelloli u fl-analiżi taċ-ċitometrija tal-fluss. Il-livell ta' riproduċibbiltà fil-previżjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mit-test hu fl-ordni ta' 80 % fi ħdan il-laboratorji u bejn il-laboratorji (3)(12). Ir-riżultati ġġenerati fl-istudju ta' validazzjoni (13) u fi studji ppubblikati oħra (14) b'mod ġenerali jindikaw li, meta mqabbla mar-riżultati tal-LLNA, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 85 % (N=142) b'sensittività ta' 93 % (94/101) u bi speċifiċità ta' 66 % (27/41) (fuq il-bażi ta' analiżi mill-ġdid minn EURL ECVAM (12) b'kunsiderazzjoni tad-*data* eżistenti kollha u mingħajr ma jiġu kkunsidrati r-riżultati negattivi għal sustanzi kimiċi b'Log Kow akbar minn 3,5 kif deskritt fil-paragrafu (4). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz bl-h-CLAT għandhom probabbiltà akbar li jikkonċernaw sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (4)(13)(15). Meħuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tal-metodu h-CLAT biex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Madankollu, il-valuri tal-akkuratezza mogħtija hawnhekk għall-h-CLAT bħala test waħdu huma indikattivi biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li t-test LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li l-metodu h-CLAT hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' mekkaniżmi ta' reazzjoni, ta' potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u ta' proprjetajiet fiżikokimiċi (3)(14)(15). Il-metodu tal-h-CLAT hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test solubbli jew li jifformaw dispersjoni stabbli (jiġifieri kollojde jew sospensjoni li fiha s-sustanza kimika tat-test ma tistabbilixxix ruħha u lanqas ma tissepara mis-solvent/mill-veikolu f'fażijiet differenti) f'solvent/veikolu xieraq (ara l-paragrafu 14). Is-sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 għandhom tendenza li jipproduċu riżultati negattivi foloz (14). Għaldaqstant, riżultati negattivi b'sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 ma għandhomx jiġu kkunsidrati. Madankollu, riżultati pożittivi miksuba b'sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 xorta waħda jistgħu jintużaw biex isostnu l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala sensitizzatur tal-ġilda. Barra minn hekk, minħabba l-kapaċità metabolika limitata tal-linja ta' ċelloli użata (16) u minħabba l-kundizzjonijiet tal-esperiment, proapteni (jiġifieri sustanzi li jeħtieġu attivazzjoni enzimatika, pereżempju enzimi P450) u preapteni (jiġifieri sustanzi attivati b'ossidazzjoni) b'mod partikolari dawk b'rata baxxa ta' ossidazzjoni jistgħu jipprovdu riżultati negattivi wkoll fl-h-CLAT (15). Is-sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti jistgħu jiġu vvalutati bl-h-CLAT (17), iżda sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom li jeħilsu l-istess tul ta' mewġa bħal istjoċjanat tal-fluworexxeina (FITC) jew bħala jodur tal-propidju (PI), jinterferixxu mad-detezzjoni ċitometrika tal-fluss u b'hekk ma jistgħux jiġu evalwati kif suppost bl-użu ta' antikorpi konjugati tal-FITC jew bl-użu tal-PI. F'każ bħal dan, antikorpi oħra taggjati bil-fluworokromu jew markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, rispettivament, jistgħu jintużaw dment li jkun jista' jintwera li jipprovdu riżultati simili bħall-antikorpi taggjati bl-FITC (ara l-paragrafu 24) jew il-PI (ara l-paragrafu 18), eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 1-2. Fid-dawl ta' dan ta' hawn fuq, riżultati negattivi għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tal-limitazzjonijiet iddikjarati u flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fi ħdan il-kuntest tal-IATA. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu h-CLAT għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, dan ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

5. Kif deskritt aktar 'il fuq, il-metodu h-CLAT isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Madankollu, għandu l-potenzjal li jikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni (4)(5)(9) ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA. Minkejja dan, hemm bżonn li jsir aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' *data* mill-bniedem, biex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tal-h-CLAT jistgħu jinformaw valutazzjoni tal-potenza.

6. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. Il-metodu h-CLAT hu assaġġ *in vitro* li jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli (jiġifieri CD86 u CD54) fuq linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana, iċ-ċelloli THP-1, wara esponiment għal 24 siegħa għas-sustanza kimika tat-test. Dawn il-molekuli tas-superfiċje huma markaturi tipiċi ta' attivazzjoni tat-THP-1 monoċitika u jistgħu jimitaw attivazzjoni tad-DC, li taqdi rwol kritiku fil-priming taċ-ċellola-T. It-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje jitkejlu b'ċitometrija tal-fluss wara tilwin taċ-ċelloli b'antikorpi taggjati bil-fluworokromu. Il-kejl taċ-ċitotossiċità jsir fl-istess ħin ukoll biex jiġi vvalutat jekk s-sovraregolazzjoni tal-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje sseħħx f'konċentrazzjonijiet subċitotossiċi. L-intensità relattiva tal-fluworexxenza tal-markaturi tas-superfiċje mqabbla mal-kontroll b'solvent/b'veikolu hi kkalkolata u tintuża fil-mudell tat-tbassir (ara l-paragrafu 26), b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

8. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 bħala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 sustanzi ta' profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 1.2. Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* ġenerata bil-kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 11) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 20-22), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

PROĊEDURA

9. Dan it-test hu bbażat fuq il-protokoll nru 158 (18) tal-h-CLAT DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) li jirrappreżenta l-protokoll użat għall-istudju ta' validazzjoni koordinat mill-EURL ECVAM. Hu rakkomandat li dan il-protokoll jintuża meta jiġi implimentat u jintuża l-metodu h-CLAT fil-laboratorju. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin għall-metodu h-CLAT, li jinvolvi żewġ stadji: *assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* u *kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54*.

Tħejjija taċ-ċelloli

10. Il-linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana, THP-1, għandha tintuża għat-twettiq tal-metodu h-CLAT. Hu rakkomandat li ċ-ċelloli (TIB-202™) jinkisbu minn bank taċ-ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection.

11. Iċ-ċelloli THP-1 huma kolturati f'37°C f'5 % CO_2 u atmosfera umidifikata f'medium RPMI-1640 supplimentat b'10 % serum bovin fetali (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanol, 100 unità/ml peniċillina u 100 μg/ml streptomiċina. L-użu tal-peniċilina u tal-istreptomiċina fil-medium tat-tkabbir jista' jiġi evitat. Madankollu, f'każ bħal dan l-utenti għandhom jivverifikaw li l-assenza ta' antibijotiċi fil-medium tat-tkabbir ma jkollha ebda impatt fuq ir-riżultati, pereżempju billi jittestjaw is-sustanzi ta' profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 1.2. Fi kwalunkwe każ, biex jimminimizzaw ir-riskju ta' kontaminazzjoni, għandhom jiġu segwiti prattiki tajbin tal-koltura taċ-ċellola indipendentement mill-preżenza jew mill-assenza ta' antibijotiċi fil-medium tat-tkabbir taċ-ċelloli. Iċ-ċelloli THP-1 jinżergħu bħala rutina kull jumejn/tlieta bid-densità ta' 0,1 sa 0,2 × 10^6 ċelloli/ml. Dawn għandhom jinżammu f'densitajiet minn 0,1 sa 1,0 × 10^6 ċelloli/ml. Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, iċ-ċelloli għandhom jiġu kwalifikati billi jsir kontroll tar-reattività. Il-kontroll tar-reattività taċ-ċelloli għandu jsir bl-użu tal-kontrolli pożittivi, it-2,4-dinitroklorobenżen (DNCB) (Nru CAS 97-00-7, ≥ 99 % purità) u s-sulfat tan-nikil ($NiSO_4$) (Nru CAS 10101-97-0, ≥ 99 % purità) u tal-kontroll negattiv, l-aċidu lattiku (LA) (Nru CAS 50-21-5, ≥ 85 % purità), ġimagħtejn wara li jinħallu. Kemm id-DNCB kif ukoll l-$NiSO_4$ għandhom jipproduċu rispons pożittiv tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 kif ukoll CD54, u l-LA għandu jipproduċi rispons negattiv tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 kif ukoll CD54. Huma biss iċ-ċelloli li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività li jintużaw għall-assaġġ. Iċ-ċelloli jistgħu jiġu propagati sa xahrejn wara li jinħallu. In-numru tal-passaġġ ma għandux jaqbeż it-30. Il-kontroll tar-reattività għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 20-24.

12. Għall-ittestjar, iċ-ċelloli THP-1 jinżergħu f'densità ta' 0,1 × 10^6 ċelloli/ml jew ta' 0,2 × 10^6 ċelloli/ml, u jiġu prekolturati fi flasks tal-koltura għal 72 siegħa jew għal 48 siegħa, rispettivament. Importanti li d-densità taċ-ċelloli fil-flask tal-koltura eżatt wara l-perjodu ta' qabel il-koltura tkun konsistenti kemm jista' jkun f'kull esperiment (billi tintuża waħda miż-żewġ kundizzjonijiet ta' prekoltura deskritti hawn fuq), għaliex id-densità taċ-ċelloli fil-flask tal-koltura eżatt wara l-prekoltura tista' taffettwa l-espressjoni ta' CD86/CD54 indotta minn allerġeni (19). Fil-jum tal-ittestjar, iċ-ċelloli miġbura mill-flask tal-koltura jerġgħu jiġu sospiżi b'medium tat-tkabbir frisk f'2 × 10^6 ċelloli/ml. Imbagħad, iċ-ċelloli jiġu distribwiti fi pjastra b'qiegħ ċatt b'24 bwejra (500 µl 1 × 10^6 ċelloli/bwejra) jew fi pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (80 µl 1,6 × 10^5 ċelloli/bwejra).

Assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża

13. *Assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* jsir għad-determinazzjoni tas-CV75, li hi l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tirriżulta f'vijabbiltà ta' 75 % taċ-ċelloli meta mqabbla mal-kontroll b'solvent/b'veikolu. Il-valur tas-CV75 jintuża biex tiġi determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-kejl tal-espressjoni ta' *CD86/CD54* (ara l-paragrafi 20-24).

Tħejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

14. Is-sustanzi kimiċi tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jitħejjew dakinhar tal-ittestjar. Għall-metodu h-CLAT, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew dispersi b'mod stabbli (ara wkoll il-paragrafu 4) f'salina jew f'medium bħala l-ewwel għażliet ta' solvent/veikolu jew f'sulfossidu tad-dimetil (DMSO, ≥ 99 % purità) bħala t-tieni għażla ta' solvent/veikolu jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli jew ma tifformax dispersjoni stabbli fiż-żewġ solventi/veikoli preċedenti, għal konċentrazzjonijiet finali ta' 100 mg/ml (f'salina jew f'medium) jew ta' 500 mg/ml (f'DMSO). Solventi/veikoli oħra li mhumiex dawk deskritti hawn fuq jistgħu jintużaw jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti. L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-veikolu finali għandha tiġi kkunsidrata.

15. Mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' 100 mg/ml (f'salina jew f'medium) jew ta' 500 mg/ml (f'DMSO) tas-sustanzi kimiċi tat-test, għandhom jitwettqu l-passi ta' dilwizzjoni li ġejjin:

— Għas-salina jew għall-medium bħala solvent/veikolu: Jitħejjew tmien soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet), b'dilwizzjonijiet serjali ta' darbtejn bl-użu tas-solvent/veikolu korrispondenti. Dawn is-soluzzjonijiet ewlenin ikomplu jiġu dilwiti 50 darba f'medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Jekk l-ogħla konċentrazzjoni finali fil-pjastra ta' 1 000 µg/ml ma tkunx tossika, il-konċentrazzjoni massima għandha terġa' tiġi determinata billi jsir test ġdid taċ-ċitotossiċità. Il-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5 000 µg/ml għal sustanzi kimiċi tat-test dissolti jew dispersi b'mod stabbli f'salina jew f'medium.

— Għal DMSO bħala solvent/veikolu. Jitħejjew tmien soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet), b'dilwizzjonijiet serjali ta' darbtejn bl-użu tas-solvent/veikolu korrispondenti. Dawn is-soluzzjonijiet ewlenin ikomplu jiġu dilwiti 250 darba f'medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Il-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż l-1 000 µg/ml anki jekk din il-konċentrazzjoni ma tkunx tossika.

Is-soluzzjonijiet għall-użu finalment jintużaw għall-esponiment billi jiżdied volum ugwali ta' soluzzjoni għall-użu fil-volum tas-sospensjoni taċ-ċelloli THP-1 fil-pjastra (ara wkoll il-paragrafu 17) biex tinkiseb dilwizzjoni ulterjuri ta' darbtejn (normalment, il-medda finali tal-konċentrazzjonijiet fil-pjastra tkun ta' 7,81–1 000 µg/ml).

16. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu użat fil-metodu h-CLAT hu l-medium tat-tkabbir (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli (ara l-paragrafu 4) b'medium jew b'salina) jew DMSO (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli f'DMSO) ittestjat f'konċentrazzjoni finali waħda fil-pjastra ta' 0,2 %. Dan issirlu l-istess dilwizzjoni bħal dik deskritta għas-soluzzjonijiet għall-użu fil-paragrafu 15.

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

17. Il-medium tat-tkabbir jew is-soluzzjonijiet għall-użu deskritti fil-paragrafi 15 u 16 jitħalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mħejjija fil-pjastra b'qiegħ ċatt b'24 bwejra jew b'96 bwejra (ara l-paragrafu 12). Imbagħad il-pjastri trattati jiġu inkubati għal 24±0,5 siegħa f'37°C f'5 % CO_2. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn bwejriet minn sustanzi kimiċi tat-test, eż. billi l-pjastra tiġi ssiġillata qabel l-inkubazzjoni bis-sustanzi kimiċi tat-test (20).

Tilwin bil-jodur tal-propidju (PI)

18. Wara esponiment għal 24±0,5 siegħa, iċ-ċelloli jiġu trasferiti f'tubi tal-kampjun u jinġabru b'ċentfigurazzjoni. Is-supernatanti jintremew u ċ-ċelloli li jifdal jiġu sospiżi mill-ġdid b'200 µl (fil-każ ta' 96 bwejra) jew b'600 µl (fil-każ ta' 24 bwejra) salina baferjata bil-fosfat li jkun fiha 0,1 % albumina tas-serum tal-bovini (bafer tat-tilwin). 200 µl sospensjoni taċ-ċelloli tiġi trasferita fi pjastra b'qiegħ għat-tond b'96 bwejra (fil-każ ta' 96 bwejra) jew f'mikrotubu (fil-każ ta' 24 bwejra) u tinħasel darbtejn b'200 µl (fil-każ ta' 96 bwejra) jew b'600 µl (fil-każ ta' 24 bwejra) ta' bafer tat-tilwin. Finalment, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'bafer tat-tilwin (eż. 400 µl) u tiżdied soluzzjoni tal-PI (eż. 20 µl) (pereżempju l-konċentrazzjoni finali tal-PI tkun ta' 0,625 µg/ml). Jistgħu jintużaw markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, bħal 7-Amminoaċtinomiċina D (7-AAD), Tripan blu jew oħrajn jekk it-tilwin alternattiv ikun jista' jintwera li jipprovdi riżultati simili bħall-PI, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 1.2.

Kejl taċ-ċitotossiċità b'ċitometrija tal-flus u bi stima tal-valur tas-CV75

19. It-teħid tal-PI jiġi analizzat bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss bil-kanal ta' akkwiżizzjoni FL-3. B'kollox jinkisbu 10 000 ċellola ħajja (negattivi għall-PI). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tista' tiġi kkalkolata bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja mill-programm ta' analiżi taċ-ċitometru. Meta l-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun baxxa, għandhom jinkisbu sa 30 000 ċellola inklużi ċ-ċelloli mejtin. Inkella, id-*data* tista' tinkiseb għal minuta waħda wara t-tnedija tal-analiżi.

$$Vijabbiltàtaċ - ċelloli = \frac{Numru\ ta'ċelloli\ hajjin}{Numru\ tatali\ ta'ċelloli\ miksuba} \times 100$$

Il-valur tas-CV75 (ara l-paragrafu 13), jiġifieri konċentrazzjoni li turi 75 % tas-sopravivenza taċ-ċelloli THP-1 (ċitotossiċità ta' 25 %), jiġi kkalkolat b'interpolazzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

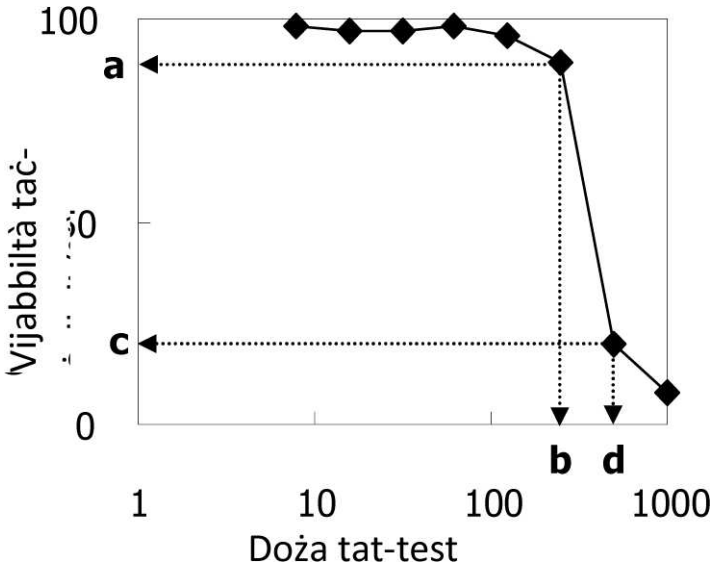
$$Log\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Log(b) - (75 - a) \times Log(d)}{a - c}$$

Fejn:

a hu l-valur minimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli ogħla minn 75 %

c hu l-valur massimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli anqas minn 75 %

b u d huma l-konċentrazzjonijiet li juru l-valur tal-vijabbiltà taċ-ċelloli a u c rispettivament



Jistgħu jintużaw approċċi oħra biex tinkiseb is-CV75 dment li jintwera li dawn ma jkollhom ebda impatt fuq ir-riżultati (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza).

Kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54

Tħejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

20. Is-solvent/il-veikolu xieraq (salina, medium jew DMSO; ara l-paragrafu 14) jintuża biex jiddisolvi jew jiddispersa b'mod stabbli is-sustanzi kimiċi tat-test. Is-sustanzi kimiċi tat-test l-ewwel jiġu dilwiti għall-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-100 darba (għas-salina jew għall-medium) jew għall-500 darba (għal DMSO) tal-1,2 × CV75 determinata fl-*assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* (ara l-paragrafu 19). Jekk is-CV75 ma tkunx tista' tiġi determinata (jiġifieri ma tiġix osservata ċitotossiċità sufficjenti fl-*assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża*), l-ogħla konċentrazzjoni solubbli jew dispersa stabbliment tas-sustanza kimika tat-test mħejjija b'kull solvent/veikolu għandha tintuża bħala l-konċentrazzjoni tat-tluq. Jekk jogħġbok kun af li l-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5 000 μg/ml (fil-każ ta' salina jew ta' medium) jew l-1 000 μg/ml (fil-każ ta' DMSO). Imbagħad isiru dilwizzjonijiet serjali ta' 1,2 darbiet bl-użu tas-solvent/tal-veikolu korrispondenti biex jinkisbu s-soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 100×1,2 × CV75 sa 100×0,335 × CV75 (għas-salina jew għall-medium) jew minn 500×1,2 × CV75 sa 500×0,335 × CV75 (għal DMSO)) li għandhom jiġu ttestjati fil-metodu h-CLAT (ara l-protokoll DB-ALM Nru 158 għal eżempju tal-iskema ta' dożaġġ). Imbagħad, is-soluzzjonijiet ewlenin jiġu dilwiti aktar għal 50 darba (għas-salina jew għall-medium) jew għal 250 darba (għal DMSO) fil-medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Dawn is-soluzzjonijiet huma dawk finalment użati għall-esponiment b'fattur finali ulterjuri ta' dilwizzjonijiet għal darbtejn fil-pjastra. Jekk ir-riżultati ma jissodisfawx il-kriterji ta' aċċettazzjoni deskritti fil-paragrafi 29 u 30 rigward il-vijabbiltà taċ-ċelloli, l-*assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* jista' jerġa' jsir biex tiġi determinata CV75 aktar preċiża. Jekk jogħġbok kun af li pjastri b'24 bwejra biss jistgħu jintużaw għall-kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54.

21. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu jitħejja kif deskritt fil-paragrafu 16. Il-kontroll pożittiv użat fil-metodu h-CLAT hu DNCB (ara l-paragrafu 11), li għalih jitħejjew soluzzjonijiet ewlenin f'DMSO u jiġu dilwiti kif deskritt għas-soluzzjonijiet ewlenin fil-paragrafu 20. DNCB għandu jintuża bħala l-kontroll pożittiv għall-*kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54* f'konċentrazzjoni waħda finali fil-pjastra (tipikament 4,0 μg/ml). Biex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 4,0 μg/ml ta' DNCB fil-pjastra, titħejja soluzzjoni ewlenija ta' 2 mg/ml ta' DNCB f'DMSO u tkompli tiġi dilwita għal 250 darba b'medium tat-tkabbir għal soluzzjoni għall-użu ta' 8 μg/ml. Inkella, is-CV75 ta' DNCB, li tiġi determinata f'kull faċilità tat-test, tista' tintuża wkoll bħala l-konċentrazzjoni tal-kontroll pożittiv. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli. Għal kontrolli pożittivi, il-konċentrazzjoni finali waħda fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5 000 μg/ml (fil-każ ta' salina jew ta' medium) jew l-1 000 μg/ml (fil-każ ta' DMSO). Il-kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjoni huma l-istess bħal dawk deskritti għas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 29), ħlief għall-aħħar kriterju ta' aċċettazzjoni peress li l-kontroll pożittiv jiġi ttestjat f'konċentrazzjoni waħda.

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

22. Għal kull sustanza kimika tat-test u sustanza tal-kontroll, hu meħtieġ esperiment wieħed biex tinkiseb previżjoni. Kull esperiment jikkonsisti f'tal-anqas żewġ sessonijiet indipendenti għall-*kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54* (ara l-paragrafu 26-28). Kull sessjoni indipendenti ssir f'jum differenti jew fl-istess jum dment li għal kull sessjoni: a) jitħejjew soluzzjonijiet ewlenin u soluzzjonijiet użati friski indipendenti tas-sustanza kimika tat-test u tas-soluzzjonijiet tal-antikorpi u b) jintużaw ċelloli miġbura indipendentement (jiġifieri ċ-ċelloli jridu jinġabru minn flasks tal-koltura differenti); madankollu, iċ-ċelloli jistgħu jkunu ġejjin mill-istess passaġġ. Sustanzi kimiċi tat-test u sustanzi tal-kontroll imħejjija bħala soluzzjonijiet għall-użu (500 μl) jitħalltu ma' 500 μl ta' ċelloli sospiżi ($1x10^6$ ċelloli) fi proporzjon ta' 1:1, u ċ-ċelloli jiġu inkubati għal 24±0,5 siegħa kif deskritt fil-paragrafi 20 u 21. F'kull sessjoni, replika waħda għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanza tal-kontroll hi biżżejjed għaliex tbassir jinkiseb minn tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti.

It-tilwin u l-analiżi taċ-ċelloli

23. Wara 24±0,5 siegħa ta' esponiment, iċ-ċelloli jiġu trasferiti minn pjastra b'24 bwejra f'tubi tal-kampjun, jinġabru b'ċentrifugrazzjoni u mbagħad jinħaslu darbtejn b'1ml ta' bafer tat-tilwin (jekk ikun hemm bżonn jistgħu jitwettqu passi addizzjonali tal-ħasil). Wara l-ħasil, iċ-ċelloli jiġu mblokkati b'600 μl soluzzjoni tal-imblokkar (bafer tat-tilwin li fih 0,01 % (w/v) globulina (frazzjoni ta' Cohn II, III, umana; SIGMA, #G2388-10G jew ekwivalenti)) u inkubati f'4°C għal 15-il min. Wara l-imblokkar, iċ-ċelloli jinqasmu fi tliet alikwoti ta' 180 μl fi pjastra b'qiegħ fit-tond b'96 bwejra jew f'mikrotubu.

24. Wara ċ-ċentrifugrazzjoni, iċ-ċelloli jitlewnu b'50 μl ta' antikorpi anti-CD86, anti-CD54 jew IgG1 tal-ġrieden (isotip) tikkettati bl-FITC f'4°C għal 30 min. L-antikorpi deskritti fil-protokoll h-CLAT DB-ALM nru 158 (18) għandhom jintużaw b'dilwizzjoni ta' 3:25 v/v (għas-CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klonu: Fun-1)) jewta' 3:50 v/v (għas-CD54 (DAKO, #F7143; Klonu: 6,5B5) u IgG1 (DAKO, #X0927)) b'bafer tat-tilwin. Dawn il-fatturi ta' dilwizzjoni tal-antikorpi ġew definiti mill-iżviluppaturi tat-testijiet bħala dawk li jipprovdu l-aħjar proporzjon minn sinjal għal

storbju. Fuq il-bażi tal-esperjenza tal-iżviluppaturi tat-test, l-intensità tal-fluworexxenza tal-antikorpi normalment tkun konsistenti bejn lottijiet differenti. Madankollu, l-utenti jistgħu jikkunsidraw it-titrazzjoni tal-antikorpi fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju tagħhom stess biex jiddefinixxu l-aħjar konċentrazzjonijiet għall-użu. Antikorpi anti-CD86 u/jew anti-CD54 oħra taggjati bil-fluworokromu jistgħu jintużaw jekk jista' jintwera li dawn jipprovdu riżultati simili bħall-antikorpi konjugati bl-FITC, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' proficjenza fl-Appendiċi 1.2. Ta' min jinnota li t-tibdil tal-klonu jew tal-fornitur tal-antikorpi kif deskritt fil-protokoll h-CLAT DB-ALM nru 158 (18) jista' jaffettwa r-riżultati. Wara l-ħasil darbtejn jew aktar b'150 µl bafer tat-tilwin, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'bafer tat-tilwin (eż. 400 µl), u tiżdied is-soluzzjoni tal-PI (eż. 20 µl biex tinkiseb konċentrazzjoni finali ta' 0,625 µg/ml) jew soluzzjoni ta' markatur ieħor taċ-ċitotossiċità (ara l-paragrafu 18). Il-livelli ta' espressjoni tas-CD86 u tas-CD54, u l-vijabbiltà taċ-ċelloli, jiġu analizzati bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss.

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-*data*

25. L-espressjoni tas-CD86 u tas-CD54 tiġi analizzat bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss bil-kanal ta' akkwiżizzjoni FL-1. Fuq il-bażi tal-intensità ġeometrika medja tal-fluworexxenza (MFI), l-intensità relattiva tal-fluworexxenza (RFI) tas-CD86 u tas-CD54 għaċ-ċelloli tal-kontroll pożittiv (ctrl) u trattati bis-sustanza kimika tiġi kkalkolata skont l-ekwazzjoni li ġejja:

$$RFI = \frac{MFI\ taċ - ċellula\ trattata\ kimika - MFI\ ta\ 'ċelloli\ ta'\ kontroll\ ta\ 'l - isotipi\ trattati\ kimiċi}{MFI\ tas - solvent/ċelloli\ ctrl\ trattati\ bil - vettura - MFI\ tas - solvent/ċelluli\ ctrl\ isotip\ trattati\ bil - vettura} \times 100$$

Il-vijabbiltà taċ-ċelloli miċ-ċelloli tal-kontroll bl-isotip (ctrl) (li jitlewnu b'antikorpi tal-IgG1 tal-ġrieden (isotip)) tiġi kkalkolata wkoll skont l-ekwazzjoni deskritta fil-paragrafu 19.

Mudell ta' tbassir

26. Għall-kejl tal-espressjoni ta' *CD86/CD54*, kull sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti biex jinkiseb tbassir wieħed (POŻITTIV jew NEGATTIV). Tbassir h-CLAT jitqies POŻITTIV jekk tal-anqas tiġi ssodisfata waħda mill-kundizzjonijiet li ġejjin fi 2 minn 2 sessjonijiet indipendenti jew f'tal-anqas 2 minn 3, inkella t-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV (Figura 1):

— L-RFI tas-CD86 tkun daqs jew akbar minn 150 % fi kwalunkwe konċentrazzjoni ttestjata (b'vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 50 %);

— L-RFI tas-CD54 tkun daqs jew akbar minn 200 % fi kwalunkwe konċentrazzjoni ttestjata (b'vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 50 %).

27. Fuq il-bażi ta' dan li ntqal hawn fuq, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu pożittivi għas-CD86 u/jew it-tnejn ikunu pożittivi għas-CD54, it-tbassir h-CLAT jitqies POŻITTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. B'mod simili, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet ikunu negattivi għaż-żewġ markaturi, it-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV (b'kunsiderazzjoni dovuta tad-dispożizzjonijiet tal-paragrafu 30) mingħajr il-bżonn tat-tielet sessjoni. Madankollu, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet ma jkunux jaqblu għal tal-anqas wieħed mill-markaturi (CD54 jew CD86), ikun hemm bżonn tat-tielet sessjoni u t-tbassir finali jkun ibbażat fuq ir-riżultat tal-maġġoranza tat-tliet sessjonijiet individwali (jiġifieri 2 minn 3). F'dan ir-rigward, ta' min jinnota li jekk isiru żewġ sessjonijiet indipendenti u waħda minnhom biss tkun pożittiva għas-CD86 (minn hawn 'il quddiem imsejħa P_1) u l-oħra tkun pożittiva biss għas-CD54 (minn hawn 'il quddiem imsejħa P_2), ikun hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Jekk din it-tielet sessjoni tkun negattiva għaż-żewġ markaturi (minn hawn 'il quddiem imsejħa N), it-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV. Minnaħa l-oħra, jekk it-tielet sessjoni tkun pożittiva għal wieħed mill-markaturi (P_1 jew P_2) jew għaż-żewġ marktaturi (minn hawn 'il quddiem imsejħa P_{12}), t

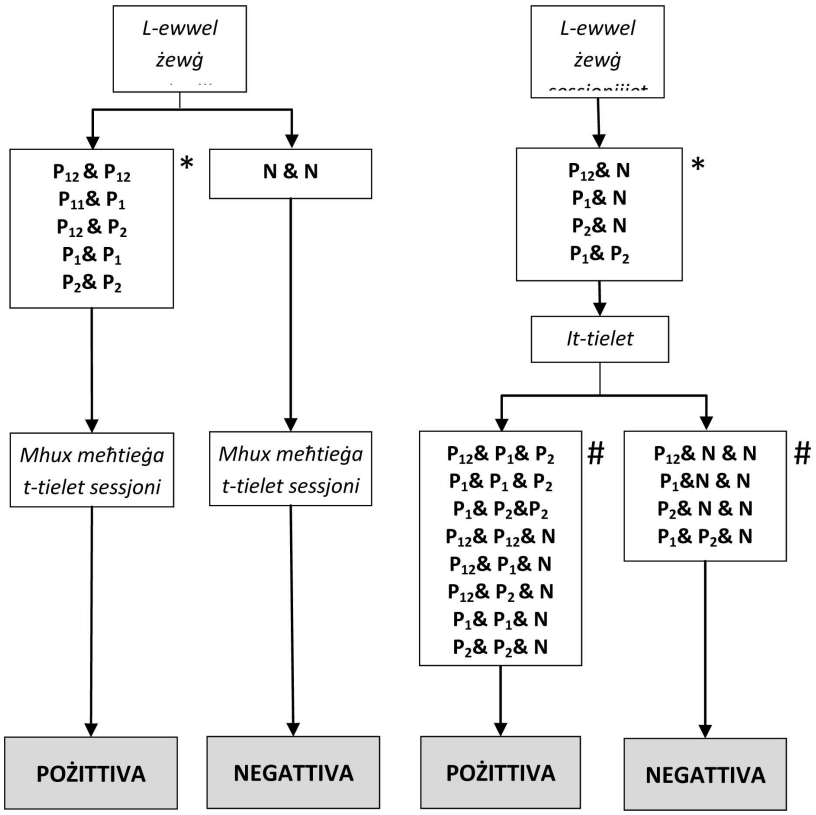


Figura 1: Mudell tat-tbassir użat fil-metodu h-CLAT. Tbassir h-CLAT għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjoni tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali.P_1: sessjoni b'CD86 pożittiv biss; P_2; sessjoni b'CD54 pożittiv biss; P_{12}: sessjoni b'CD86 kif ukoll CD54 pożittivi; N: sessjoni mingħajr CD86 u CD54 pożittivi. *Il-kaxex juru t-taħlitiet rilevanti tar-riżultati mill-ewwel żewġ sessjonijiet, indipendentement mill-ordni li fiha jistgħu jinkisbu. #Il-kaxex juru t-taħlitiet rilevanti ta' riżultati mit-tliet sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel żewġ sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq, iżda ma jirriflettux l-ordni li fiha jistgħu jinkisbu.

28. Għas-sustanzi kimiċi tat-test imbassra bħala POŻITTIVI bl-h-CLAT, b'mod fakultattiv jistgħu jiġu determinati żewġ valuri tal-Konċentrazzjonijiet Effettivi (EC), l-EC150 għas-CD86 u l-EC200 għas-CD54, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha s-sustanzi kimiċi tat-test jinduċu RFI ta' 150 jew ta' 200. Dawn il-valuri tal-EC potenzjalment jistgħu jikkontribwixxu għall-valutazzjoni tal-potenza tas-sensitizzazzjoni (9) meta jintużaw f'approċċi integrati bħall-IATA (4) (5) (6) (7) (8). Dawn jistgħu jiġu kkalkolati bl-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

fejn

A_{conc} hi l-anqas konċentrazzjoni f'µg/ml bl-RFI > 150 (CD86) jew 200 (CD54)

B_{conc} hi l-ogħla konċentrazzjoni f'µg/ml bl-RFI < 150 (CD86) jew 200 (CD54)

A_{RFI} hi l-RFI fl-anqas konċentrazzjoni bl-RFI > 150 (CD86) jew 200 (CD54)

B_{RFI} hi l-RFI fl-ogħla konċentrazzjoni bl-RFI < 150 (CD86) jew 200 (CD54)

Għall-fini ta' derivazzjoni aktar preċiża tal-valuri tal-EC150 u tal-EC200, jistgħu jkunu meħtieġa tliet sessjonijiet indipendenti għall-*kejl tal-espressjoni tas-CD86/CD54*. Imbagħad il-valuri finali tal-EC150 u tal-EC200 jiġu determinati bħala l-valur medjan tal-ECs ikkalkolati mit-tliet sessjonijiet indipendenti. Meta tnejn biss mit-tliet sessjonijiet indipendenti jissodisfaw il-kriterji għall-pożittività (ara l-paragrafi 26-27), tiġi adottata l-ogħla waħda mill-EC150 jew mill-EC200 taż-żewġ valuri kkalkolati.

Kriterji ta' aċċettazzjoni

29. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża l-metodu h-CLAT (22) (27).

— Il-vijabbiltajiet taċ-ċelloli tal-medium u l-kontrolli b'solvent/b'veikolu għandhom ikunu akbar minn 90 %.

— Fil-kontroll b'solvent/b'veikolu, il-valuri tal-RFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 ma għandhomx jaqbżu l-kriterji pożittivi (CD86 RFI ≥ 150 % u CD54 RFI ≥ 200 %). Il-valuri tal-RFI tal-kontroll b'solvent/b'veikolu jiġu kkalkolati bl-użu tal-formula deskritta fil-paragrafu 25 (MFI tas-sustanza kimika għandha tiġi sostitwita bMFI tas-solvent/tal-veikolu, u MFI tas-solvent/tal-veikolu għandha tiġi sostitwita bMFI ta' kontroll (b'medium)).

— Għall-kontrolli b'medium kif ukoll dawk b'solvent/b'veikolu, il-proporzjon tal-MFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 għall-kontroll b'isotip għandu jkun > 105 %.

— Fil-kontroll pożittiv (DNCB), il-valuri tal-RFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 għandhom jissodisfaw il-kriterji pożittivi (CD86 RFI ≥ 150 u CD54 RFI ≥ 200) u l-vijabbiltà taċ-ċelloli għandha tkun akbar minn 50 %.

— Għas-sustanza kimika tat-test, il-vijabbiltà taċ-ċelloli għandha tkun akbar minn 50 % f'tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet ittestjati f'kull sessjoni.

30. Ir-riżultati negattivi jkunu aċċettabbli biss għal sustanzi kimiċi tat-test li jesibixxu vijabbiltà taċ-ċelloli ta' anqas minn 90 % fl-ogħla konċentrazzjoni ttestjata (jiġifieri 1,2 × CV75 skont l-iskema ta' dilwizzjonijiet serjali deskritta fil-paragrafu 20). Jekk il-vijabbiltà taċ-ċelloli f'1,2 × CV75 tkun daqs jew akbar minn 90 %, ir-riżultat negattiv għandu jiġi injorat. F'dan il-każ, hu rakkomandat li wieħed jipprova jirfina l-għażla tad-doża billi jirrepeti d-determinazzjoni tas-CV75. Ta' min jinnota li meta jintużaw 5 000 μg/ml f'salina (jew f'medium jew f'solventi/veikoli oħra), 1 000 μg/ml f'DMSO jew l-ogħla konċentrazzjoni solubbli bħala l-konċentrazzjoni massimali tat-test ta' sustanza kimika tat-test, riżultat negattiv ikun aċċettabbli anki jekk il-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun akbar minn 90 %.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test

Sustanza monokostitwenti

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, il-Log Kow, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżiko-kimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita

— Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Kontrolli

Kontroll pożittiv

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, il-Log K_{ow} is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżiko-kimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv u b'solvent/b'veikolu

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintuża solvent/veikolu ieħor li ma jkunx fost dawk imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Il-kundizzjonijiet tat-test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tat-test użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-faċilità mnejn inkisbet);

— Iċ-ċitometrija tal-fluss użata (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrumenti, il-globulina, l-antikorpi u l-markatur taċ-ċitotossiċità użat;

— Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tat-test bl-ittestjar ta' sustanzi ta' profiċjenza, u l-proċedura użata biex tintwera prestazzjoni riproduċibbli tat-test maż-żmien, eż. *data* storika tal-kontroll u/jew *data* storika tal-kontrolli tar-reattività.

Kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test

— Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, tal-MFI u tal-RFI miksuba bil-kontroll b'solvent/b'veikolu meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;

— Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tal-RFI miksuba bil-kontroll pożittiv meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;

— Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-konċentrazzjonijiet ittestjati kollha tas-sustanza kimika tat-test.

Il-proċedura tat-test

— In-numru ta' sessjonijiet użati;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika, l-applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment użat (jekk ikun differenti minn dak rakkomandat)

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

— Tabulazzjoni tad-*data*, inklużi s-CV75 (jekk applikabbli), il-valuri ġeometriċi tal-MFI, tal-RFI u tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, il-valuri tal-EC150/EC200 (jekk applikabbli) miksuba għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontroll pożittiv f'kull sessjoni, u indikazzjoni tal-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont il-mudell tat-tbassir;

— Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-riżultati

— Diskussjoni tar-riżultati miksubin bil-metodu h-CLAT;

— Kunsiderazzjoni tar-riżultati tat-test fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Aċċessibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Aċċessibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Aċċessibbli fuq: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Aċċessibbli fuq: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi, Franza, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) In-Nazzjonijiet Uniti (2013) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Appendiċi 1.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (21).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (22).

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew taħlita

CV75: Il-konċentrazzjoni stmata li turi vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 75 %.

EC150: il-konċentrazzjonijiet li juru l-valuri tal-RFI ta' 150 fl-espressjoni ta' CD86

EC200: il-konċentrazzjonijiet li juru l-valuri tal-RFI ta' 200 fl-espressjoni ta' CD54

Ċitometrija tal-fluss: teknika ċitometrika li fiha ċ-ċelloli sospiżi fi fluwidu jiffluwixxu waħda, waħda permezz ta' fokus ta' dawl tal-eċitament, li jitferrex f'mudelli karatteristiċi għaċ-ċelloli u għall-komponenti tagħhom; iċ-ċelloli spiss jiġu tikkettati b'markaturi fluworexxenti biex id-dawl l-ewwel jiġi assorbit imbagħad jinħeles fi frekwenzi differenti.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), għall-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew għall-valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-ħtieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

Kontroll b'medium: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn biex jiġi determinat jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tul iż-żmien tkun tista' tiġi vvalutata, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Preapteni: sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika

Proapteni: sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jeħilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda

Intensità relattiva tal-fluworexxenza (RFI): Valuri relattivi tal-intensità medja ġeometrika tal-fluworexxenza (MFI) f'ċelloli trattati bis-sustanza kimika meta mqabbla mal-MFI f'ċelloli trattati b'solvent/b'veikolu.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (21).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorarji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (21).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (21).

Bafer tat-tilwin: Salina baferjata b'fosfat li fiha 0,1 % albumina tas-serum tal-bovini.

Kontroll b'solvent/b'veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test ħlief tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bażi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbliment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull addittiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mingħajr ma tinbidel il-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (23).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Test validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (21).

Appendiċi 1.2

SUSTANZI TA' PROFIĊJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu b'mod korrett it-tbassir mistenni tal-h-CLAT għall-10 sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri tas-CV70, tal-EC150 u tal-EC200 li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza. Is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bil-metodu h-CLAT. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għall-metodu h-CLAT (3) (14).

Tabella 1

Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bil-metodu h-CLAT

Sustanzi ta' Profiċjenza	CASRN	Stat fiżiku	Tbassir *in vivo* (1)	Medda ta' Riferiment ta' CV75 f'µg/ml (2)	Riżultati tal-h-CLAT għal CD86 (Medda ta' Riferiment ta' EC150 f'µg/ml) (2)	Riżultati tal-h-CLAT għal CD54 (Medda ta' Riferiment ta' EC200 f'µg/ml) (2)
2,4-Dinitroklorobenżen	97-00-7	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	2-12	Pożittiv (0,5-10)	Pożittiv (0,5-15)
4-Fenilenediammina	106-50-3	Solidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	5-95	Pożittiv (<40)	Negattiv (>1,5) (3)
Sulfat tan-nikil	10101-97-0	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	30-500	Pożittiv (<100)	Pożittiv (10-100)
2-Merkaptbenżotjażol	149-30-4	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	30-400	Negattiv (>10) (3)	Pożittiv (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Likwidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	>20	Negattiv (>5) (3)	Pożittiv (<250)
Urea tal-imidażolidinil	39236-46-9	Solidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	25-100	Pożittiv (20-90)	Pożittiv (20-75)
Isopropanol.	67-63-0	Likwidu	Mhux sensitizzatur	>5 000	Negattiv (>5 000)	Negattiv (>5 000)
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	>5 000	Negattiv (>5 000)	Negattiv (>5 000)
Aċidu lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	1500-5 000	Negattiv (>5 000)	Negattiv (>5 000)
4-aċidu aminobenżojku	150-13-0	Solidu	Mhux sensitizzatur	>1 000	Negattiv (>1 000)	Negattiv (>1 000)

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

(1) It-tbassir tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* hu bbażat fuq *data* tal-LLNA (3) (14). Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (24).

(2) Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (13) (25).

(3) Storikament, maġġoranza tar-riżultati negattivi nkisbet għal dan il-markatur u, għalhekk, hu primarjament mistenni riżultat negattiv. Il-medda pprovduta ġiet definita fuq il-bażi tal-ftit riżultati pożittivi storiċi osservati. F'każ li jinkiseb riżultat pożittiv, il-valur tal-EC għandu jkun fi ħdan il-medda ta' riferiment rapportata.

Appendiċi 2

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TA' ATTIVAZZJONI TAL-LINJA TA' ĊELLOLI U937 (U-SENS™)

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. It-test U-SENS™ jikkwantifika t-tibdil fl-espressjoni ta' markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjat mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u taċ-ċelloli dendritiċi (DC) (jiġifieri CD86), fil-linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana U937, wara esponiment għas-sensitizzaturi (1). Il-livelli ta' espressjoni mkejla tal-markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 fil-linja ta' ċelloli U937 imbagħad jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.

2. It-test U-SENS™ ġie evalwat fi studju tal-validazzjoni (2) koordinat minn L'Oreal u wara sarlu rieżami bejn il-pari indipendenti mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv (ESAC) tal-Laboratorju ta' Riferiment tal-Unjoni Ewropea għall-Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Annimali (EURL ECVAM) (3). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, il-U-SENS™ kien rakkomandat mill-EURL ECVAM (4) biex jintuża bħala parti minn IATA b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini ta' klassifikazzjoni u ta' tikkettar tal-perikli. Fid-dokument ta' gwida tagħha dwar ir-rapportar ta' approċċi strutturata għall-integrazzjoni tad-*data* u għas-sorsi ta' informazzjoni individwali użati fi ħdan IATA għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, bħalissa l-OECD qed tiddiskuti numru ta' studji tal-każ li jiddeskrivu strateġiji ta' ttestjar u mudelli ta' tbassir differenti. Wieħed mill-approċċi definiti differenti hu bbażat fuq l-assaġġ U-SENS (5). Eżempji tal-użu ta' *data* ta' U-SENS™ flimkien ma' informazzjoni oħra, inkluża *data* storika u *data* umana valida eżistenti (6), huma rapportati wkoll f'postijiet oħra fid-dokumentazzjoni (4) (5) (7).

3. It-test U-SENS™ wera li kien trasferibbli għal-laboratorji esperjenzati f'tekniki tal-koltura taċ-ċelloli u fl-analiżi taċ-ċitometrija tal-fluss. Il-livell ta' riproduċibbiltà fil-previżjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mit-test hu fl-ordni ta' 90 % u 84 % fi ħdan il-laboratorji u bejn il-laboratorji, rispettivament (8). Ir-riżultati ġġenerati fl-istudju ta' validazzjoni (8) u fi studji ppubblikati oħra (1) b'mod ġenerali jindikaw li, meta mqabbla mar-riżultati tal-LLNA, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 86 % (N=166) b'sensittività ta' 91 % (118/129) u bi speċifiċità ta' 65 % (24/37). Meta mqabbla mar-riżultati umani, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 77 % (N=101) b'sensittività ta' 100 % (58/58) u bi speċifiċità ta' 47 % (20/43). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz imqabbla mal-LLNA bil-U-SENS™ għandhom probabbiltà akbar li jikkonċernaw sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (1) (8) (9). Meħuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tat-test U-SENS™ biex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Madankollu, il-valuri tal-akkuratezza mogħtija hawnhekk għall-U-SENS™ bħala test waħdu huma indikattivi biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li t-test LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li t-test U-SENS™ kien applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test (inklużi ingredjenti kożmetiċi, eż. preservattivi, tensjoattivi, attivi, koloranti) li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' proprjetajiet fiżikokimiċi, ta' potenza ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif determinata fi studji *in vivo*) u tal-ispettru ta' mekkaniżmi ta' reazzjoni magħruf li jkunu assoċjati ma' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri aċċettatur ta' Michael, formazzjoni bażi ta' Schiff, aġent ta' trasferiment tal-aċil, sostituzzjoni nukleofilika bimolekultari [SN2], jew sostituzzjoni aromatika nukleofilika [SNAr]) (1) (8) (9) (10). It-test U-SENS™ hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li huma solubbli jew li jifformaw dispersjoni stabbli (jiġifieri kollojde jew sospensjoni li fiha s-sustanza kimika tat-test ma tistabbilixxix ruħha u lanqas ma tissepara mis-solvent/mill-veikolu f'fażijiet differenti) f'solvent/veikolu xieraq (ara l-paragrafu 13). Sustanzi kimiċi fis-sett tad-*data* rapportat bħala preapteni (jiġifieri sustanzi attivati b'ossidazzjoni) jew proapteni (jiġifieri sustanzi li jeħtieġu attivazzjoni enzimatika, pereżempju permezz tal-enzimi P450) tbassru kif suppost mill-U-SENS™ (1) (10). Sustanzi li jinterferixxu mal-membrana jistgħu jwasslu għal riżultatipożittivi

foloz minħabba żieda mhux speċifika ta' espressjoni ta' CD86, hekk kif tlieta minn seba' pożittivi foloz relatati mal-klassifikazzjoni ta' riferiment *in vivo* kienu tensjoattivi (1). B'hekk, riżultati pożittivi b'tensjoattivi għandhom jiġu kkunsidrati bil-galbu filwaqt li riżultati negattivi b'tensjoattivi xorta waħda jistgħu jintużaw b'sostenn tal-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala mhux sensitizzatur. Is-sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti jistgħu jiġu vvalutati bil-U-SENS™ (1), iżda sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom li jeħilsu l-istess tul ta' mewġa bħal istjoċjanat tal-fluworexxeina (FITC) jew bħala jodur tal-propidju (PI), jinterferixxu mad-detezzjoni ċitometrika tal-fluss u b'hekk ma jistgħux jiġu evalwati kif suppost bl-użu ta' antikorpi konjugati tal-FITC (negattiv falz potenzjali) jew bl-użu tal-PI (il-vijabbiltà ma tistax titkejjel). F'każ bħal dan, antikorpi oħra taggjati bi fluworokromu jew markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, rispettivament, jistgħu jintużaw dment li jkun jista' jintwera li jipprovdu riżultati simili bħall-antikorpi taggjati bl-FITC jew il-PI (ara l-paragrafu 18), eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Fid-dawl ta' dan ta' hawn fuq, ir-riżultati pożittivi b'tensjoattivi u r-riżultati negattivi b'sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tal-limitazzjonijiet iddikjarati u flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fi ħdan il-kuntest tal-IATA. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tat-test U-SENS™ għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, dan ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

5. Kif deskritt aktar 'il fuq, it-test U-SENS™ isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Madankollu, għandu l-potenzjal li jikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA. Minkejja dan, hemm bżonn li jsir aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' data mill-bniedem, biex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tal-U-SENS™ jistgħu jinformaw valutazzjoni tal-potenza.

6. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 2.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. It-test U-SENS™ hu assaġġ *in vitro* li jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 fuq linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana, iċ-ċelloli U937, wara esponiment għal 45±3 siegħat għas-sustanza kimika tat-test. Il-markatur tas-superfiċje CD86 hu markatur tipiku minnhom tal-attivazzjoni tal-U937. Is-CD86 hu magħruf bħala molekula kostimolatorja li tista' timita l-attivazzjoni monoċitika, li taqdi rwol kritiku fil-primazzjoni taċ-ċelloli-T. It-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 jitkejlu b'ċitometrija tal-fluss wara tilwin taċ-ċelloli, tipikament b'antikorpi tikkettati (bl-FITC) tal-istjoċjanat tal-fluworexxeina. Il-kejl taċ-ċitotossiċità jsir fl-istess ħin ukoll (eż. bl-użu tal-PI) biex jiġi vvalutat jekk s-sovraregolazzjoni tal-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 isseħħx f'konċentrazzjonijiet subċitotossiċi. L-indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tal-markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli mqabbel mal-kontroll b'solvent/b'veikolu hu kkalkolat u jintuża fil-mudell tat-tbassir (ara l-paragrafu 19), b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

8. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 bħala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 11 f'konformità mal-Prattiki Tajba tal-Metodi *in vitro* (11). Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* ġenerata bil-kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 11) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 15-16), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

PROĊEDURA

9. Dan it-test hu bbażat fuq il-protokoll nru 183 (12) tal-U-SENS™ DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM). Għandhom jitħaddmu l-Proċeduri Operatorji Standard (SOP) meta jiġi implimentat u meta jintuża t-test U-SENS™ fil-laboratorju. Tista' tintuża sistema awtomatizzata biex isir il-U-SENS™ jekk ikun jista' jintwera li din tipprovdi riżultati simili, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin għat-test U-SENS™.

Tħejjija taċ-ċelloli

10. Il-linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana, U937 (13), għandha tintuża għat-twettiq tat-test U-SENS™. Iċ-ċelloli (klonu CRL1593.2) għandhom jinkisbu minn bank taċ-ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection.

11. Iċ-ċelloli U937 huma kolturati f'37°C f'5 % CO_2 u atmosfera umidifikata f'medium RPMI-1 640 supplimentat b'10 % serum tal-għoġġiela fetali (FCS), 2 mM L-glutammina, 100 unità/ml peniċillina u 100 µg/ml streptomiċina (medium komplut). Iċ-ċelloli U937 jiġu passaġġati bħala rutina kull jumejn/tlieta bid-densità ta' 1,5 jew 3 × 10^5 ċelloli/ml, rispettivament. Id-densità taċ-ċelloli ma għandhiex taqbeż it-2 × 10^6 ċelloli/ml u l-vijabbiltà taċ-ċelloli mkejla bl-esklużjoni tal-blu tirpan għandha tkun ≥ 90 % (ma għandhiex tiġi applikata fl-ewwel passaġġ wara t-taħlil). Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, kull lott ta' ċelloli, ta' FCS jew ta' antikorp għandu jiġi kwalifikat billi jsir kontroll tar-reattività. Il-kontroll tar-reattività taċ-ċelloli għandu jsir bl-użu tal-kontroll pożittiv, l-aċidu pikrilsulfoniku (2,4,6-Trinitrobenżen-aċidu sulfoniku: TNBS) (CASRN 2 508-19-2, ≥ 99 % purità), u l-kontroll negattiv, aċidu lattiku (LA) (CASRN 50-21-5, ≥ 85 % purità), tal-anqas ġimgħa wara t-taħlil. Għall-kontroll tar-reattività, għandhom jiġu ttestjati sitt konċentrazzjonijiet finali għal kull wieħed miż-2 kontrolli (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100µg/ml u LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). TNBS solubilizzat f'medium komplut għandu jipproduċi rispons pożittiv u relatat mal-konċentrazzjoni tas-CD86 (eż. meta konċentrazzjoni pożittiva, S.I. tas-CD86 ≥ 150, tkun segwita minn konċentrazzjoni b'S.I. tas-CD86 li jibqa' jiżdied), u LA solubilizzat f'medium komplut għandu jipproduċi rispons negattiv tas-CD86 (ara l-paragrafu 21). Hu biss il-lott ta' ċelloli li jgħaddi mill-kontroll tar-reattività darbtejn li għandu jintuża għall-assaġġ. Iċ-ċelloli jistgħu jiġu propagati sa seba' ġimgħat wara li jinħallu. In-numru tal-passaġġ ma għandux jaqbeż il-21. Il-kontroll tar-reattività għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 18-22.

12. Għall-ittestjar, iċ-ċelloli U937 jinżergħu f'densità ta' 3 x 10^5 ċelloli/ml jew 6 × 10^5 ċelloli/ml, u jiġu prekolturati fi flasks tal-koltura għal jumejn jew għal jum (1), rispettivament. Jistgħu jintużaw kundizzjonijiet prekolturati oħra differenti minn dawk deskritti hawn fuq jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti u jekk ikun jista' jintwera li dawn jipprovdu riżultati simili, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' proficjenza fl-Appendiċi 2.2. Fil-jum tal-ittestjar, iċ-ċelloli miġbura mill-flask tal-koltura jerġgħu jiġu sospiżi b'medium tat-tkabbir frisk f'5 × 10^5 ċelloli/ml. Imbagħad, iċ-ċelloli jitqassmu fi pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra b'100 µl (densità finali taċ-ċelloli ta' 0,5 × 10^5 ċelloli/bwejra).

Tħejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

13. Il-valutazzjoni tas-solubbiltà ssir qabel l-ittestjar. Għal dan l-għan, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew dispersi b'mod stabbli f'konċentrazzjoni ta' 50 mg/ml f'medium komplut bħala s-solvent tal-ewwel għażla jew id-dimetil sulfossidu (DMSO, ≥ 99 % purità) bħala s-solvent/il-veikolu tat-tieni għażla jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fis-solvent/fil-veikolu tal-medium komplut. Għall-ittestjar, is-sustanza kimika tat-test tiġi dissolta sa konċentrazzjoni finali ta' 0,4 mg/ml f'medium komplut jekk is-sustanza kimika tkun solubbli f'dan is-solvent/il-veikolu. Jekk is-sustanza kimika tkun solubbli f'DMSO biss, is-sustanza kimika tiġi dissolta f'konċentrazzjoni ta' 50 mg/ml. Solventi/veikoli oħra li mhumiex dawk deskritti hawn fuq jistgħu jintużaw jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti. L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-veikolu finali għandha tiġi kkunsidrata.

14. Is-sustanzi kimiċi tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jitħejjew dakinhar tal-ittestjar. Minħabba li ma jsirx assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża, għall-ewwel sessjoni għandhom jiġu ttestjati sitt konċentrazzjonijiet finali (1, 10, 20, 50, 100 u 200 µg/ml) fis-solvent/fil-veikolu korrispondenti f'medium komplut jew inkella f'medium ta' 0,4 % DMSO. Għas-sessjonijiet sussegwenti, b'bidu miż-0,4 mg/ml f'medium komplut jew b'50 mg/ml f'DMSO, is-soluzzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-anqas jitħejjew 4 soluzzjonijiet għall-użu (jiġifieri tal-anqas 4 konċentrazzjonijiet) bl-użu tas-solvent/tal-veikolu korrispondenti. Is-soluzzjonijiet għall-użu finalment jintużaw għat-trattament billi jiżdied volum ugwali ta' sospensjoni taċ-ċelloli U937 (ara l-paragrafu 11 aktar 'il fuq) mal-volum tas-soluzzjoni għall-użu fil-pjastra biex tinkiseb dilwizzjoni ulterjuri ta' darbtejn (12). Il-konċentrazzjonijiet (tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet) għal kwalunkwe sessjoni ulterjuri jintgħażlu fuq il-bażi tar-riżultati individwali tas-sessjonijiet preċedenti kollha (8). Il-konċentrazzjonijiet finali utilizzabbli huma ta' 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 u 200 µg/ml. Il-konċentrazzjoni finali massima hi ta' 200 µg/ml. Fil-każ li jiġi osservat valur pożittiv tas-CD86 f'1 µg/ml, 0,1 µg/ml tiġi evalwata biex tinstab il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li ma tinduċix is-CD86 f'livell ogħla mil-limitu pożittiv. Għal kull sessjoni, l-EC150

(konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tilħaq il-limitu pożittiv ta' CD86 ta' 150 %, ara l-paragrafu 19) tiġi kkalkolata jekk jiġi osservat rispons pożittiv għall-konċentrazzjoni tas-CD86. Meta s-sustanza kimika tat-test tinduċi rispons pożittiv għas-CD86 li ma jkunx relatat mal-konċentrazzjoni, il-kalkolu tal-EC150 jaf ma jkunx rilevanti kif deskritt fil-protokoll nru 183 (12) tad-DB-ALM tal-U-SENS™. Għal kull sessjoni, is-CV70 (konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tilħaq il-limitu ta' ċitotossiċità ta' 70 %, ara l-paragrafu 19) tiġi kkalkolata kull fejn possibbli (12). Biex jiġi investigat l-effett tar-rispons għal konċentrazzjoni ta' żieda fis-CD86, kwalunkwe konċentrazzjoni mill-konċentrazzjonijiet utilizzabbli għandha tingħażel eżatt f'nofs l-EC150 (jew l-ogħla konċentrazzjoni mhux ċitotossika negattiva tas-CD86) u s-CV70 (jew l-ogħla konċentrazzjoni awtorizzata, jiġifieri 200 µg/ml). Tal-anqas għandhom jiġu ttestjati 4 konċentrazzjonijiet għal kull sessjoni b'tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet li jkunu komuni għas-sessjoni(jiet) preċedenti, għall-finijiet ta' tqabbil.

15. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu użat fit-test U-SENS™ hu medium komplut (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli f'medium komplut) (ara l-paragrafu 4) jew 0,4 % DMSO f'medium komplut (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli fid-DMSO).

16. Il-kontroll pożittiv użat fit-test U-SENS™ hu TNBS (ara l-paragrafu 11), imħejji f'medium komplut. TNBS għandu jintuża bħala l-kontroll pożittiv għall-kejl tal-espressjoni ta' CD86 f'konċentrazzjoni waħda finali fil-pjastra (50 µg/ml) li trendi > 70 % tal-vijabbiltà taċ-ċelloli. Biex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 50 µg/ml ta' TNBS fil-pjastra, soluzzjoni ewlenija ta' 1 M (jiġifieri 293 mg/ml) ta' TNBS f'medium komplut titħejja u tkompli tiġi dilwita għal 2 930 darba b'medium komplut għal soluzzjoni għall-użu ta' 100 µg/ml. L-aċidu lattiku (LA, CAS 50-21-5) għandu jintuża bħala l-kontroll negattiv f'200 µg/ml solubilizzat f'medium komplut (minn soluzzjoni ewlenija ta' 0,4 mg/ml). F'kull pjastra ta' kull sessjoni, jitħejjew tliet repliki ta' kontroll mhux trattat ta' medium komplut, ta' kontroll b'solvent/b'veikolu, u ta' kontrolli negattivi u pożittivi (12). Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli. Il-kriterji ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni huma l-istess bħal dawk deskritti għas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 12).

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

17. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu jew is-soluzzjonijiet għall-użu deskritti fil-paragrafi 14-16 jitħalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mħejjija fil-pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (ara l-paragrafu 12). Imbagħad il-pjastri trattati jiġu inkubati għal 45±3 siegħa f'37°C f'5 % CO_2. Qabel l-inkubazzjoni, il-pjastri jiġu ssiġillati b'membrana semipermeabbli, biex jiġu evitati evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn ċelloli trattati bis-sustanzi kimiċi tat-test (12).

Tilwin taċ-ċelloli

18. Wara esponiment għal 45±3 siegħa, iċ-ċelloli jiġu trasferiti fi pjastra għall-mikrotitraġġ forma ta' V u jinġabru b'ċentfigurazzjoni. L-interferenza tas-solubbiltà hi definita bħala kristalli jew taqtiriet osservati taħt il-mikroskopju 45 ± 3 sigħat wara t-trattament (qabel it-tilwin taċ-ċelloli). Is-supernatanti jintremew u ċ-ċelloli li jifdal jinħaslu darba b'100 µl salina baferjata tal-fosfat (PBS) kiesħa silġ li jkun fiha 5 % serum tal-għoġġiela fetali (bafer tat-tilwin). Wara ċ-ċentrifugrazzjoni, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi b'100 µl bafer tat-tilwin u jitlewnu b'5 µl (eż. 0,25 µg) antikorpi anti-CD86 tikkettati bl-FITC jew tal-IgG1 (isotip) tal-ġrieden f'4°C għal 30 min protetti mid-dawl. Għandhom jintużaw l-antikorpi deskritti fil-protokoll nru 183 tad-DB-ALM ta' U-SENS™ (12) (għal CD86: BD-PharMingen #5556 57 Klonu: Fun-1, jew Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Klonu: BU63; u għal IgG1; BD-PharMingen #5557 48, jew Caltag/Invitrogen # GM4992). Fuq il-bażi tal-esperjenza tal-iżviluppaturi tat-test, l-intensità tal-fluworexxenza tal-antikorpi normalment tkun konsistenti bejn lottijiet differenti. Kloni oħra jew fornitur ieħor tal-antikorpi li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività jistgħu jintużaw għall-assaġġ (ara l-paragrafu 11). Madankollu, l-utenti jistgħu jikkunsidraw it-titrazzjoni tal-antikorpi fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju tagħhom stess biex jiddefinixxu l-aħjarkonċentrazzjoni

għall-użu. Tista' tintuża sistema oħra ta' identifikazzjoni, eż. antikorpi anti-CD86 taggjati bil-fluworokromu, jekk jista' jintwera li din tipprovdi riżultati simili bħall-antikorpi konjugati bl-FITC, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' proficjenza fl-Appendiċi 2.2. Wara l-ħasil b'100 µl bafer tat-tilwin darbtejn u darba b'100 µl PBS kiesħa silġ, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'PBS kiesħa silġ (eż. 125 µl għal kampjuni li jiġu analizzati manwalment tubu, tubu, jew 50 µl bl-użu ta' pjastra tal-awtokampjunar) u tiżdied soluzzjoni tal-PI (konċentrazzjoni finali ta' 3 µg/ml). Jistgħu jintużaw markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, bħal 7-Amminoaċtinomiċina D (7-AAD) jew Tripan blu jekk it-tilwin alternattiv ikun jista' jintwera li jipprovdi riżultati simili bħall-PI, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' proficjenza fl-Appendiċi 2.2.

Analiżi taċ-ċitometrija tal-fluss

19. Il-livell ta' espressjoni tas-CD86 u l-vijabbiltà taċ-ċelloli jiġu analizzati bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss. Iċ-ċelloli jintwerew fi ħdan dot plot tad-daqs (FSC) u tal-granularità (SSC) stabbilita għall-iskala log biex tiġi identifikata biċ-ċar il-popolazzjoni fl-ewwel gate R1 u jiġu eliminati l-fdalijiet. Jinkiseb total fil-mira ta' 10 000 ċellola fil-gate R1 għal kull bwejra. Iċ-ċelloli mill-istess gate R1 jintwerew fi ħdan dot pot FL3 jew FL4 / SSC. Iċ-ċelloli vijabbli jiġu delineati billi titqiegħed it-tieni gate R2 li tagħżel il-popolazzjoni taċ-ċelloli negattivi għall-jodur tal-propidju (kanal FL3 jew FL4). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tista' tiġi kkalkolata bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja mill-programm ta' analiżi taċ-ċitometru. Meta l-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun baxxa, ikunu jistgħu jinkisbu sa 20 000 ċellola inklużi ċ-ċelloli mejtin. Inkella, id-*data* tista' tinkiseb għal minuta waħda wara t-tnedija tal-analiżi.

$$Vijabbiltà\ taċ-ċelloli = \frac{Numru\ ta'\ ċelloli\ ħajjin}{umber\ totali\ ta'\ ċelloli\ miksubin} \times 100$$

Imbagħad il-perċentwal ta' ċelloli pożittivi għall-FL1 jitkejjel fost dawn iċ-ċelloli vijabbli li jkunu ġew gated fl-R2 (fi ħdan l-R1). L-espressjoni tas-superfiċje taċ-ċeloli tas-CD86 tiġi analizzata f'dot plot FL1 / SSC li tkun gated fuq ċelloli vijabbli (R2).

Għall-medium komplut / għall-bwejriet tal-IgG1, il-markatur tal-analiżi jiġi stabbilit qrib il-popolazzjoni ewlenija biex il-kontrolli tal-medium komplut ikollhom IgG1 fi ħdan iż-żona fil-mira ta' 0,6 sa 0,9 %.

L-interferenza tal-kulur hi definita bħala ċaqliq tad-dot plot tal-IgG1 tikkettat bl-FITC (S.I. Ġeo Medju tal-FL1 tal-IgG1 ≥ 150 %).

L-indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tas-CD86 għaċ-ċelloli tal-kontrolli (mhux trattati jew f'0,4 % DMSO) u għaċ-ċelloli trattati b'sustanza kimika jiġi kkalkolat skont l-ekwazzjoni li ġejja:.

$$S.I. = \frac{\%\ taċ-ċelloli\ trattati\ bis-CD86^{+} - \%\ taċ-ċelloli\ trattati\ bl-IgG1^{+}}{\%\ taċ-ċelloli\ tal-kontroll\ bis-CD86^{+} \%\ taċ-ċelloli\ tal-kontroll\ bl-IgG1^{+}} \times 100$$

% taċ-ċelloli tal-kontroll mhux trattati bl-IgG1^{+}: imsejjaħ bħala l-perċentwal taċ-ċelloli IgG1 pożittivi għall-FL1 definiti bil-markatur tal-analiżi (medda aċċettata ta' ≥ 0,6 % u < 1,5 %, ara l-paragrafu 22) fost iċ-ċelloli mhux trattati vijabbli.

% taċ-ċelloli tal-kontroll/trattati bl-IgG1^{+}/CD86^{+}: imsejjaħ il-perċentwal ta' ċelloli IgG1/CD86 pożittivi għall-FL1 imkejjel mingħajr ma jiċċaqlaq il-markatur tal-analiżi fost iċ-ċelloli tal-kontroll/trattati vijabbli.

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-*data*

20. Il-parametri li ġejjin huma kkalkolati fit-test U-SENS™: Il-valur tas-CV70, jiġifieri konċentrazzjoni li turi 70 % tas-sopravivenza taċ-ċelloli U937 (30 % ċitotossiċità) u l-valur tal-EC150, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha s-sustanzi kimiċi tat-test jinduċu indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tas-CD86 ta' 150 %.

Is-CV70 hi kkalkolata b'interpolazzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

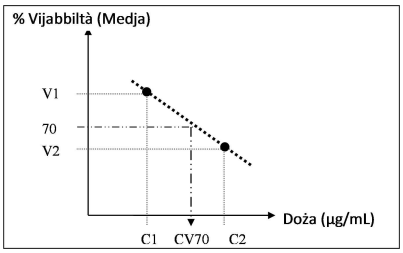
CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 − V2) * (C2 − C1)]

Fejn:

V1 hu l-valur minimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli ogħla minn 70 %

V2 hu l-valur massimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli anqas minn 70 %

C1 u C2 huma l-konċentrazzjonijiet li juru l-valur tal-vijabbiltà taċ-ċelloli V1 u V2 rispettivament.



Jistgħu jintużaw approċċi oħra biex tinkiseb is-CV70 dment li jintwera li dawn ma jkollhom ebda impatt fuq ir-riżultati (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza).

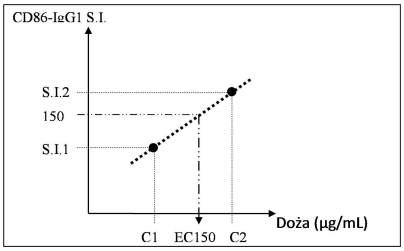
Is-EC150 hi kkalkolata b'interpolazzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

EC150 = C1 + [(150 − S.I.1) / (S.I.2 − S.I.1) * (C2 − C1)]

Fejn:

C1 hi l-ogħla konċentrazzjoni f'µg/ml b'CD86 S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 hi l-anqas konċentrazzjoni f'µg/ml b'CD86 S.I. ≥ 150 % (S.I. 2)



Il-valuri tal-EC150 u tas-CV70 jiġu kkalkolati

— għal kull sessjoni: il-valuri individwali tal-EC150 u tas-CV70 jintużaw bħala għodod biex jiġi investigat l-effett ta' rispons għall-konċentrazzjoni taż-żieda ta' CD86 (ara l-paragrafu 14).

— fuq il-bażi tal-vijabbiltajiet medji, tiġi determinata s-CV70 ġenerali (12),

— fuq il-bażi tal-S.I. medju tal-valuri tas-CD86, l-EC150 ġenerali tiġi determinata għas-sustanza kimika tat-test prevista bħala POŻITTIVA bil-U-SENS™ (ara l-paragrafu 21) (12).

Mudell ta' tbassir

21. Għall-kejl tal-espressjoni tas-CD86, kull sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata f'tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet u f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti biex jinkiseb tbassir wieħed (NEGATTIV jew POŻITTIV).

— Il-konklużjoni individwali ta' sessjoni ta' U-SENS™ titqies NEGATTIVA (minn hawn 'il quddiem imsejħa N) jekk l-S.I. tas-CD86 ikun anqas minn 150 % fil-konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi kollha (vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 70 %) u jekk ma tiġi osservata ebda interferenza (ċitotossiċità, solubbiltà: ara l-paragrafu 18 jew kulur: ara l-paragrafu 19 indipendentement mill-konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi li fihom tiġi individwata l-interferenza. Fil-każijiet l-oħra kollha: S.I. ta' CD86 ta' 150 % jew ogħla u/jew interferenzi osservati, il-konklużjoni individwali ta' sessjoni ta' U-SENS™ titqies Pożittiva (minn hawn 'il quddiem imsejħa P).

— Tbassir ta' U-SENS™ jitqies NEGATTIV jekk tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti jiġu negattivi (N) (Figura 1). Jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu negattivi (N), it-tbassir ta' U-SENS™ jitqies NEGATTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni.

— Tbassir ta' U-SENS™ jitqies POŻITTIV jekk tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti jiġu pożittivi (P) (Figura 1). Jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu pożittivi (P), it-tbassir ta' U-SENS™ jitqies POŻITTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni.

— Peress li ma jsirx assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża, hemm eċċezzjoni jekk, fl-ewwel sessjoni, l-S.I. ta' CD86 ikun 150 % jew akbar fl-ogħla konċentrazzjoni mhux ċitotossika biss. Imbagħad is-sessjoni titqies MHUX KONKLUŻIVA (NC), u konċentrazzjonijiet addizzjonali (bejn l-ogħla konċentrazzjoni mingħajr ċitotossiċità u l-anqas konċentrazzjoni ta' ċitotossiċità - ara l-paragrafu 20) għandhom jiġu ttestjati f'sessjonijiet addizzjonali. F'każ li sessjoni tiġi identifikata bħala NC, tal-anqas għandhom isiru żewġ sessjonijiet addizzjonali, u r-raba' sessjoni f'każ li t-tieni u t-tielet sessjonijiet ma jkunux jaqblu (N u/jew P indipendentement) (Figura 1). Sessjonijiet ta' segwitu jitqiesu pożittivi anki jekk konċentrazzjoni ċitotossika waħda biss tagħti CD86 ta' 150 % jew aktar, peress li l-issettjar tal-konċentrazzjoni ġie aġġustat għas-sustanza kimika tat-test speċifika. It-tbassir finali jkun ibbażat fuq ir-riżultat tal-maġġoranza tat-tliet jew tal-erba' sessjonijiet individwali (jiġifieri tnejn minn tlieta jew tnejn minn erbgħa) (Figura 1).

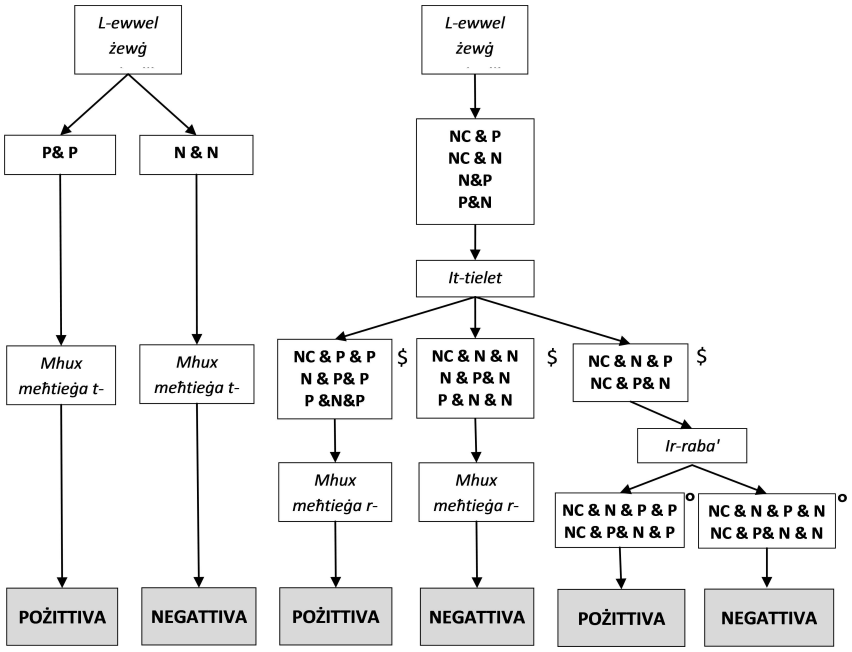


Figura 1: Mudell ta' tbassir użat fit-test U-SENS™ Tbassir U-SENS™ għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjoni tal-paragrafu 4 u tal-paragrafi 7, 8 u 9 tal-Introduzzjoni ġenerali.

N: Sessjoni b'ebda CD86 pożittiv jew interferenza osservati;

P: Sessjoni b'CD86 pożittiv jew interferenza/i osservati;

NC: Mhux Konklużiva. L-ewwel sessjoni b'Ebda Konklużjoni meta s-CD86 ikun pożittiv fl-ogħla konċentrazzjoni mhux ċitotossika biss;

#: Konklużjoni individwali Mhux Konklużiva (NC) attribwita biss għall-ewwel sessjoni twassal b'mod awtomatiku għall-ħtieġa li ssir it-tielet sessjoni biex tintlaħaq maġġoranza ta' konklużjonijiet Pożittivi (P) jew Negattivi (N) f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti minn tlieta.

$: #Il-kaxex juru t-taħlitiet rilevanti ta' riżultati mit-tliet sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel żewġ sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq.

°: #Il-kaxex juru t-taħlitiet rilevanti ta' riżultati mill-erba' sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel tliet sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq.

Kriterji ta' aċċettazzjoni

22. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża t-test U-SENS™ (12).

— Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment ta' 45±3 siegħat, il-vijabbiltà medja taċ-ċelloli U937 mhux trattati fi triplikat kellha tkun > 90 % u ma tiġi osservata ebda deriva fl-espressjoni tas-CD86. L-espressjoni bażali tas-CD86 ta' ċelloli U937 mhux trattati kellha taqa' fi ħdan il-medda ta' ≥ 2 % u ≤ 25 %.

— Meta jintuża DMSO bħala solvent, il-validità tal-kontroll b'veikolu DMSO tiġi vvalutata bil-kalkolu tal-S.I. ta' DMSO meta mqabbel ma' ċelloli mhux trattati, u l-vijabbiltà medja taċ-ċelloli triplikati kellha tkun > 90 %. Il-kontroll b'veikolu DMSO jkun validu jekk il-valur medju tal-S.I. tas-CD86 fi triplikat tiegħu jkun iżgħar minn 250 % tal-medja tal-S.I. as-CD86 fi triplikat taċ-ċelloli U937 mhux trattati.

— Is-sessjonijiet jitqiesu validi jekk tal-anqas tnejn minn tliet valuri tal-IgG1 taċ-ċelloli U937 mhux trattati jaqgħu fi ħdan il-medda ta' ≥ 0,6 % u < 1,5 %.

— Il-kontroll negattiv (aċidu lattiku) ittestjat b'mod konkorrenti jitqies validu jekk tal-anqas tnejn mit-tliet repliki jkunu negattivi (S.I. tas-CD86 < 150 %) u mhux ċitotossiċi (vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 70 %).

— Il-kontroll pożittiv (TNBS) jitqies validu jekk tal-anqas tnejn mit-tliet repliki jkunu pożittivi (S.I. tas-CD86 ≥ 150 %) u mhux ċitotossiċi (vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 70 %).

Rapport tat-test

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

Sustanza Kimika tat-Test

Sustanza monokostitwenti

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà f'medium komplut, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżiko-kimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita:

— Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà f'medium komplut, is-solubbiltà fid-DMSO, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Kontrolli

Kontroll pożittiv

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv u b'solvent/b'veikolu

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintuża solvent/veikolu ieħor li ma jkunx fost dawk imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tat-test użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-faċilità mnejn inkisbet);

— Iċ-ċitometrija tal-fluss użata (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrumenti, l-antikorpi u l-markatur taċ-ċitotossiċità użat;

— Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tat-test bl-ittestjar ta' sustanzi ta' profiċjenza, u l-proċedura użata biex tintwera prestazzjoni riproduċibbli tat-test maż-żmien, eż. *data* storika tal-kontroll u/jew *data* storika tal-kontrolli tar-reattività.

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test

— Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tal-S.I. tas-CD86 miksuba bil-kontroll b'solvent/b'veikolu meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;

— Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tas-S.I. miksuba bil-kontroll pożittiv meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;

— Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-konċentrazzjonijiet ittestjati kollha tas-sustanza kimika tat-test.

Il-proċedura tat-test

— In-numru ta' sessjonijiet użati;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika, l-applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment użat (jekk ikun differenti minn dak rakkomandat)

— Id-durata tal-esponiment;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

— Tabulazzjoni tad-*data*, inklużi s-CV70 (jekk applikabbli), l-S.I., il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, il-valuri tal-EC150 (jekk applikabbli) miksuba għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontroll pożittiv f'kull sessjoni, u indikazzjoni tal-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont il-mudell tat-tbassir;

— Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-Riżultati

— Diskussjoni tar-riżultati miksuba bit-test U-SENS™;

— Kunsiderazzjoni tar-riżultati tat-test fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dan huwa disponibbli mis-sit web li ġej: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Disponibbli fuq: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Disponibbli fuq: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683-1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Dan huwa disponibbli mis-sit web li ġej: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line
(U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) In-Nazzjonijiet Uniti (2015) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Disponibbli fuq: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06. %20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Appendiċi 2.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (14).

AOP (Perkors tal-Eżitu Avvers): sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (15).

Rispons għall-konċentrazzjoni tas-CD86: Hemm dipendenza tal-konċentrazzjoni (jew rispons għall-konċentrazzjoni) meta konċentrazzjoni pożittiva (S.I. tas-CD86 ≥ 150) tkun segwita minn konċentrazzjoni b'S.I. li jiżdied tas-CD86.

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew taħlita

CV70: Il-konċentrazzjoni stmata li turi vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 70 %.

Deriva: Deriva hi definita i) mill-valur ikkoreġut tal-%$CD86^+$ tar-replika tal-kontroll mhux trattat 3 ikun anqas minn 50 % tal-medja tal-valur ikkoreġut tal-%$CD86^+$ tar-repliki tal-kontroll mhux trattat 1 u 2; u ii) mill-valur ikkoreġut tal-%$CD86^+$ tar-replika tal-kontroll negattiv 3 ikun anqas minn 50 % tal-medja tal-valur ikkoreġut tal-%$CD86^+$ tar-repliki tal-kontroll negattiv 1 u 2.

EC150: il-konċentrazzjonijiet stmati li juru l-S.I. ta' 150 % tal-espressjoni tas-CD86.

Ċitometrija tal-fluss: teknika ċitometrika li fiha ċ-ċelloli sospiżi fi fluwidu jiffluwixxu waħda, waħda permezz ta' fokus ta' dawl tal-eċitament, li jitferrex f'mudelli karatteristiċi għaċ-ċelloli u għall-komponenti tagħhom; iċ-ċelloli spiss jiġu tikkettati b'markaturi fluworexxenti biex id-dawl l-ewwel jiġi assorbit imbagħad jinħeles fi frekwenzi differenti.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), għall-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew għall-valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-ħtieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn kostitwent ewlieni wieħed ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Preapteni: sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika, eż. permezz ta' ossidazzjoni.

Proapteni: sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jeħilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (14).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorarji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (14).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

S.I.: Indiċi ta' Stimolazzjoni. Valuri relattivi tal-intensità medja ġeometrika tal-fluworexxenza f'ċelloli trattati bis-sustanza kimika meta mqabbla ma' ċelloli trattati b'solvent.

Kontroll b'solvent/veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test ħlief tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bażi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbliment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

Bafer tat-tilwin: Salina baferjata bil-fosfat li fiha 5 % serum tal-għoġġiela fetali.

Sustanza: Element kimiku u l-komposti tiegħu fl-istat naturali jew mislut minn kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, li jinduċi kull additiv neċessarju għall-preżervazzjoni tal-istabbiltà tiegħu u kwalunkwe impurità li tirriżulta mill-proċess użat, iżda bl-esklużjoni ta' kull solvent li jista' jkun separat mingħajr ma tkun effettwata l-istabbiltà tas-sustanza jew mibdula l-kompożizzjoni tagħha.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan it-test.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (16).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Test validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (18).

Appendiċi 2.2

SUSTANZI TA' PROFIĊJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu b'mod korrett it-tbassir mistenni ta' U-SENS™ għall-10 sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri tas-CV70 u tal-EC150 li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza. Is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bit-test U-SENS™. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għat-test U-SENS™ (1) (8).

Tabella 1

Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bit-test U-SENS™

Sustanzi ta' profiċjenza	**CASRN**	**Stat fiżiku**	**Tbassir *in vivo*** [1]	**U-SENS Solvent/Veikolu**	**U-SENS Medda ta' Riferiment ta' CV70 f'µg/ml** [2]	**U-SENS Medda ta' Riferiment ta' EC150 f'µg/ml** [2]
4-Fenilenediammina	106-50-3	Solidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	Medium komplut [3]	<30	Pożittiv (≤10)
Aċidu sulfoniku pikril	2508-19-2	Likwidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	Medium komplut	>50	Pożittiv (≤50)
Dietilmaleat	141-05-9	Likwidu	Sensitizzatur (moderat)	DMSO	10-100	Pożittiv (≤20)
Resorċinol	108-46-3	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	Medium komplut	>100	Pożittiv (≤50)
Alkoħol ċinnamiku	104-54-1	Solidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	DMSO	>100	Pożittiv (10-100)
4-Allilanisol	140-67-0	Likwidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	DMSO	>100	Pożittiv (<200)
Sakkarina	81-07-2	Solidu	Mhux sensitizzatur	DMSO	>200	Negattiv (>200)
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Medium komplut	>200	Negattiv (>200)
Aċidu lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Medium komplut	>200	Negattiv (>200)
Aċidu saliċiliku	69-72-7	Solidu	Mhux sensitizzatur	DMSO	>200	Negattiv (>200)

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

[1] It-tbassir tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* hu bbażat fuq *data* tal-LLNA (1) (8). Il-potenza *in vivo* tinkiseb tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (17).

[2] Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (1) (8).

[3] Medium komplut: Medium RPMI-1640 supplimentat b'10 % serum tal-għoġġiela fetali, 2 mM L-glutammina, 100 unità/ml peniċillina u 100 µg/ml steptomiċina (8).

Appendiċi 3

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: ASSAĠĠ IL-8 LUC

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. Għall-kuntrarju ta' assaġġi li janalizzaw l-espressjoni ta' markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli, l-assaġġ IL8-Luc jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-IL-8, ċitokina assoċjata mal-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi (DC). Fil-linja ta' ċelloli indikatur IL-8 derivata mit-THP-1 (THP-G8, stabbilita mil-linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika akuta umana THP-1), l-espressjoni tal-IL-8 titkejjel wara l-esponiment għal sensitizzaturi (1). Imbagħad l-espressjoni tal-luċiferaži tintuża biex tgħin fid-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.

2. L-assaġġ IL-8 ġie evalwat fi studju ta' validazzjoni (2) imwettaq mill-Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (JaCVAM), mill-**Ministeru tal-Ekonomija, tal-Kummerċ u tal-Industrija** (METI), u mill-Japanese Society **for Alternatives to Animal Experiments (JSAAE**) u mbagħad ġie soġġett għal rieżami bejn il-pari indipendenti (3) taħt l-awspiċji tal-JaCVAM u tal-Ministeru tas-Saħħa, tax-Xogħol u tas-Sigurtà Soċjali (MHLW) bl-appoġġ tal-**International Cooperation on Alternative Test** Methods (ICATM). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, l-assaġġ IL-8 LUC hu meqjus sewwi bħala parti minn IATA għaddiskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini ta' klassifikazzjoni u ta' tikkettar tal-perikli. Eżempji tal-użu tad-*data* tal-assaġġ IL-8 Luc flimkien ma' informazzjoni oħra huma rapportati fid-dokumentazzjoni (4) (5) (6).

3. L-assaġġ IL-8 Luc wera li kien trasferibbli għal laboratorji esperjenzati fil-koltura taċ-ċelloli u fil-ġestjoni tal-luċiferaži. Ir-riproduċibbiltajiet fi ħdan u bejn il-laboratorji kienu ta' 87,7 % u ta' 87,5 %, rispettivament (2). *Data* ġenerata fl-istudju ta' validazzjoni (2) u xogħol ippubblikat ieħor (1) (6) turi li kontra l-LLNA, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 118 minn 143 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u ġġudika 25 sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza tal-assaġġ IL-8 Luc fid-distinzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda (Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minnonsensitizzaturi (Ebda Kat. tal-GHS tan-NU/tas-CLP) hi ta' 86 % (101/118) b'sensittività ta' 96 % (92/96) u bi speċifiċità ta' 41 % (9/22). Eskluži sustanzi li jaqgħu barra d-dominju ta' applikabbiltà deskritt hawn taħt (paragrafu 5), l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 113 minn 136 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u ġġudika 23 sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza tal-assaġġ IL-8 Luc hi ta' 89 % (101/103) b'sensittività ta' 96 % (92/96) u bi speċifiċità ta' 53 % (9/17). Bl-użu tad-*data* umana ċċitata f'Urbisch et al. (7), l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 76 minn 90 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u ġġudika 14-il sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza hi ta' 80 % (61/76) is-sensittività hi ta' 93 % (54/58) u l-ispeċifiċità hi ta' 39 % (7/18). Eskluži sustanzi li jaqgħu barra d-dominju ta' applikabbiltà, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 71 minn 84 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u ġġudika 13-il sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza hi ta' 86 % (61/71 b'sensittività ta' 93 % (54/58) u bi speċifiċità ta' 54 % (7/13). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz bl-assaġġ IL-8 Luc għandhom probabbiltà akbar li jseħħu b'sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa/moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn dawk b'potenza għolja (subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (6). F'daqqa, l-informazzjoni ssostni rwol għall-assaġġ IL-8 Luc fl-identifikazzjoni ta' perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-akkuratezza mogħtija għall-assaġġ IL-8 Luc bħala test waħdu hi indikattiva biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati testijiet mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li l-LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li l-assaġġ IL-8 Luc hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' mekkaniżmi ta' reazzjoni, ta' potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u ta' proprjetajiet fiżikokimiċi (2) (6).

5. Għalkemm l-assaġġ IL-8 Luc juża X-VIVO™ 15 bħala solvent, hu evalwa korrettament sustanzi kimiċi b'Log K_{ow} >3,5 u dawk b'solubbiltà fl-ilma ta' madwar 100 μg/ ml kif ikkalkolati b'EPI Suite™ u l-prestazzjoni tiegħu biex jindividwa sensitizzaturi b'solubbiltà batuta fl-ilma hi aħjar minn dik tal-assaġġ IL-8 Luc bl-użu tas-sulfossidu tad-dimetil (DMSO) bħala solvent (2). Madankollu, riżultati negattivi għas-sustanzi kimiċi tat-test li mhumiex dissolti f'20 mg/ml jistgħu jipproduċu riżultati ta' negattivi foloz minħabba n-nuqqas ta' ħila tagħhom li jiddisolvu f'X-VIVO™ 15. Għaldaqstant, riżultati negattivi għal dawn is-sustanzi kimiċi ma għandhomx jiġu kkunsidrati. Fl-istudju ta' validazzjoni ġiet osservata rata għolja ta' negattivi foloz għall-anidridi. Barra minn hekk, minħabba l-kapaċità metabolika limitata tal-linja ta' ċelloli (8) u l-kundizzjonijiet esperimentali, il-proapteni (sustanzi li jeħtieġu attivazzjoni metabolika) u l-preapteni (sustanzi attivati bl-ossidazzjoni tal-arja) jistgħu jagħtu riżultati negattivi fl-assaġġ. Madankollu, għalkemm ir-riżultati negattivi għal pre/proapteni suspettati għandhom jiġu interpretati b'attenzjoni, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika korrettament 11 minn 11-il preapten, 6/6 proapteni, u 6/8 pre/proapteni fis-sett ta' *data* tal-assaġġ IL-8 Luc (2). Fuq il-bażi tar-rieżami komprensiv riċenti fuq tliet testijiet mhux fuq l-annimali (id-DPRA, il-KeratinoSens™ u l-h-CLAT) biex jiġu individwati pre u proapteni (9), u fuq il-bażi tal-fatt li ċ-ċelloli THP-G8 użati fl-assaġġ IL-8 Luc huma linja ta' ċelloli derivata mit-THP-1 li tintuża fl-h-CLAT, l-assaġġ IL-8 Luc jista' jikkontribwixxi wkoll biex tiżdied is-sensittività ta' testijiet mhux fuq l-annimali biex jindividwaw pre u proapteni fit-taħlita ta' testijiet oħra. It-tensjoattivi ttestjati s'issa taw riżultati pożittivi (foloz) indipendentement mit-tip tagħhom (eż. katjoniċi, anjoniċi jew nonjoniċi). Finalment sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-luċiferaži jistgħu jħawdu l-attività/il-kejl tagħha, u jikkawżaw inibizzjoni apparenti jew luminexxenza akbar (10). Pereżempju, konċentrazzjonijiet ta' fitoestroġenu akbar minn 1μM ġew rapportati li jinterferixxu ma' sinjali ta' luminexxenza f'assaġġi oħra tal-ġene indikatur abbaži tal-luċiferaži minħabba sovrattivazzjoni tal-ġene indikatur tal-luċiferaži. Bħala konsegwenza, l-espressjoni tal-luċiferaži miksuba f'konċentrazzjonijiet għoljin ta' fitoestroġeni jew ta' komposti suspettati li jipproduċu attivazzjoni simili għall-fitoestroġenu tal-ġene indikatur tal-luċiferaži trid tiġi eżaminata bir-reqqa (11). Fuq il-bażi ta' dan li ntqal hawn fuq, tensjoattivi, anidridi u sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-luċiferaži jaqgħu barra mid-dominju ta' applikabbiltà ta' dan l-assaġġ. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tal-assaġġ IL-8 Luc għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, it-test ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

6. Kif deskritt aktar 'il fuq, l-assaġġ IL-8 Luc isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Hu meħtieġ aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' *data* umana, biex jiġi determinat jekk ir-riżultati tal-IL-8 Luc jistgħux jikkontribwixxu għall-valutazzjoni tal-potenza meta meqjusa flimkien ma' sorsi ta' informazzjoni oħra.

7. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 3.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

8. L-assaġġ IL-8 jagħmel użu minn linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana THP-1 li nkisbet mingħand l-American Type Culture Collection (Manassas, VA, l-Istati Uniti). Bl-użu ta' din il-linja ta' ċelloli, id-Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine, stabbilixxa linja ta' ċelloli indikatur tal-IL-8 derivata mit-THP-1, THP-G8, li tħaddan fiha l-ġeni tal-luċiferaži Luċiferaži Stabbli Oranġjo (SLO) u l-Luċiferaži Stabbli Ħamra (SLR) taħt il-kontroll tal-IL-8 u promoturi tal-**gliċeraldeid 3-fosfat deidroġenasi** (GAPDH), rispettivament (1). Dan jippermetti l-kejl kwantitattiv tal-induzzjoni tal-ġeni tal-luċiferaži bid-detezzjoni tal-luminexxenza minn substrati tal-luċiferaži ferm stabbiliti li jipproduċu d-dawl bħala indikatur tal-attività tal-IL-8 u tal-GAPDH fiċ-ċelloli wara l-esponiment għal sustanzi kimiċi sensitizzanti.

9. Is-sistema ta' assaġġ b'kulur doppju tinvolvi luċiferaži li temetti l-oranġjo (SLO; λmass = 580 nm) (12) għall-espressjoni ġenika tal-promotur tal-IL-8 kif ukoll luċiferaži li temetti l-aħmar (SLR; λmass = 630 nm) (13) għall-espressjoni ġenika tal-promotur tal-kontroll intern, GAPDH. Iż-żewġ luċiferażijiet jemettu kuluri differenti malli jirreaġixxu mal-luċiferina-d tal-fireflies u l-luminexxenza tagħhom titkejjel b'mod simultanju f'reazzjoni bi stadju wieħed billi l-emissjoni tiġi diviża mit-taħlita tal-assaġġ bl-użu ta' filtru ottiku (14) (Appendiċi 3.2).

10. Iċ-ċelloli THP-G8 huma trattati għal 16-il siegħa bis-sustanza kimika tat-test, u wara dan jitkejlu l-attività tal-luċiferaži tal-SLO (SLO-LA) li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8 u l-attività tal-luċiferaži tal-SLR (SLR-LA) li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH. Biex l-abbrevjazzjonijiet ikunu jistgħu jinftiehmu faċilment, SLO-LA u SLR-LA huma msemmija IL8LA u GAPLA, rispettivament. It-Tabella 1 tagħti deskrizzjoni tat-termini assoċjati mal-attività tal-luċiferaži fl-assaġġ IL-8 Luc. Il-valuri mkejla jintużaw biex tiġi kkalkolata l-IL8LA normalizzata (nIL8LA), li hi l-proporzjon tal-IL8LA għall-GAPLA; l-induzzjoni tal-nIL8LA (Ind-IL8LA), li hi l-proporzjon tal-medji aritmetiċi tal-valuri mkejla kwadrupli tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanza kimika tat-test u l-valuri tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 mhux trattati; u l-inibizzjoni tal-GAPLA (inh-GAPLA), li hi l-proporzjon tal-medji aritmetiċi tal-valuri mkejla kwadrupli tal-GAPLA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanza kimika tat-test u l-valuri tal-GAPLA taċ-ċelloli THP-G8 mhux trattati, u użati bħala indikatur għaċ-ċitotossiċità.

Tabella 1

Deskrizzjoni tat-termini assoċjati mal-attività tal-luċiferaži fl-assaġġ IL-8 Luc

Abbrevjazzjonijiet	Definizzjoni
GAPLA	Attività ta' luċiferaži tal-SLR li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH
IL8LA	Attività ta' luċiferaži tal-SLO li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi / nIL8LA taċ-ċelloli mhux trattati
Inh-GAPLA	GAPLA tat-THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi / GAPLA taċ-ċelloli mhux trattati
CV05	L-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li fiha Inh-GAPLA ssir < 0,05.

11. L-istandards tal-prestazzjoni (PS) (15) huma disponibbli biex tiġi faċilitata l-validazzjoni tat-testijiet modifikati *in vitro* tal-luċiferaži tal-IL-8 simili għall-assaġġ IL-8 Luc u jippermettu l-emendar fil-ħin tal-Linja Gwida tat-Test 442E tal-OECD għall-inklużjoni tagħhom. Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* (MAD) mill-OECD se tkun garantita biss għal testijiet validati skont il-PS, jekk dawn it-testijiet ikunu ġew rieżaminati u inklużi fil-Linja Gwida tat-Test 442E mill-OECD (16).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

12. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 bħala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 3.3 f'konformità mal-Prattiki Tajba tal-Metodi *in vitro* (11). Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* ġenerata bil-kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 15) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 21-24), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

PROĊEDURA

13. Il-Proċedura Operattiva Standard (SOP) għall-assaġġ IL-8 Luc hi disponibbli u għandha titħaddem meta jitwettaq it-test (18). Il-laboratorji li lesti li jwettqu t-test jistgħu jiksbu l-linja ta' ċelloli rikombinanti THP-G8 mill-GPC Lab. Co. Ltd.,Tottori,

il-Ġappun, wara li jiffirmaw Ftehim ta' Trasferiment tal-Materjal (MTA) f'konformità mal-kundizzjonijiet tal-mudell tal-OECD. Il-paragrafi li ġejjin jipprovdu deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin tal-assaġġ.

Tħejjija taċ-ċelloli

14. Il-linja ta' ċelloli THP-G8 mill-GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, il-Ġappun, għandha tintuża għat-twettiq tal-assaġġ IL-8 Luc (ara l-paragrafi 8 u 13). Malli jiġu riċevuti, iċ-ċelloli jiġu propagati (2-4 passiġġieri) u jinħażnu ffriżati bħala stokk omoġenu. Iċ-ċelloli minn dan l-istokk jistgħu jiġu propagati sa massimu ta' 12-il passaġġ jew sa massimu ta' 6 ġimgħat. Il-medium użat għall-propagazzjoni hu l-medium tat-tkabbir RPMI-1640 li fih 10 % serum tal-bovini fetali (FBS), soluzzjoni antibijotika/antimikotika (100U/ml peniċillina G, 100µg/ml streptomiċina u 0,25µg/ml amfoteriċina B f'0,85 % salina) (eż. GIBCO Cat#15240-062), 0,15µg/ml Puromiċina (eż. CAS:58-58-2) u 300µg/ml G418 (eż. CAS:108321-42-2).

15. Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, iċ-ċelloli għandhom jiġu kwalifikati billi jsir kontroll tar-reattività. Dan il-kontroll għandu jsir ġimgħa/ġimagħtejn jew 2-4 passaġġi wara t-taħlil, bl-użu tal-kontroll pożittiv, 4-nitrobenżil bromur (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99 % purità) u l-kontroll negattiv, aċidu lattiku (LA) (CAS:50-21-5, ≥85 % purità). 4-NBB għandu jipproduċi rispons pożittiv għall-Ind-IL8LA (≥1,4), filwaqt li l-LA għandu jipproduċi rispons negattiv għall-Ind-IL8LA (<1,4). Huma biss iċ-ċelloli li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività li jintużaw għall-assaġġ. Il-kontroll għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 22-24.

16. Għall-ittestjar, iċ-ċelloli THP-G8 jinżergħu f'densità ta' 2 sa 5 × 10^5 ċelloli/ml, u jiġu prekolturati fi flasks tal-koltura għal għal 48 sa 96 siegħa. Fil-jum tat-test, iċ-ċelloli miġbura mill-flask tal-koltura jinħaslu bl-RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS mingħajr ebda antibijotiku, u mbagħad jerġgħu jiġu sospiżi b'RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS mingħajr ebda antibijotiku f'1 × 10^6 ċelloli/ml. Imbagħad, iċ-ċelloli jitqassmu fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (eż. Costar Cat#3603) b'50µl (5 × 10^4 ċelloli/bwejra).

Tħejjija tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

17. Is-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jitħejjew dakinhar tal-ittestjar. Għall-assaġġ IL-8 Luc, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti f'X-VIVO™ 15, medium ħieles mis-serum disponibbli kummerċjalment (Lonza, 04-418Q), għall-konċentrazzjoni finali ta' 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 jiżdied ma' 20 mg tas-sustanza kimika tat-test (indipendentement mis-solubbiltà tas-sustanza kimika) f'tubu tal-mikroċentrifugazzjoni u jinġieb għal volum ta' 1ml u mbagħad jiġi vortiċifikat bis-saħħa u jitħawwad fuq rotor b'veloċità massima ta' 8 rpm għal 30 min f'temperatura ambjentali ta' madwar 20°C. Barra minn hekk, jekk is-sustanzi kimiċi solidi jibqgħu insolubbli, it-tubu jiġi sonikat sakemm is-sustanza kimika tiddisolvi kompletament jew tiġi dispersa b'mod stabbli. Għal sustanzi kimiċi tat-test solubbli f'X-VIVO™ 15, is-soluzzjoni tiġi dilwita b'fattur ta' 5 b'X-VIVO™ 15 u tintuża bħala soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanza kimika tat-test (4 mg/ml). Għal sustanzi kimiċi tat-test mhux solubbli f'X-VIVO™ 15, it-taħlita terġa' tiġi rotata għal tal-anqas 30 min, u mbagħad ċentrifugata fi 15,000 rpm (≈20000*g*) għal 5 min; is-supernatant li jirriżulta jintuża bħala soluzzjoni ewlenija X-VIVO™ 15 tas-sustanza kimika tat-test. Għandha tiġi pprovduta motivazzjoni xjentifika għall-użu ta' solventi oħra, bħal DMSO, ilma, jew il-medium tat-tkabbir. Il-proċedura dettaljata għad-dissoluzzjoni tas-sustanzi kimiċi hi murija fl-Appendiċi 3.5. Is-soluzzjonijiet ta' X-VIVO™ 15 deskritti fil-paragrafi 18-23 jitħalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mħejjija fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (ara l-paragrafu 16).

18. L-ewwel sessjoni tat-test għandha l-għan li tiddetermina l-konċentrazzjoni ċitotossika u li teżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Bl-użu ta' X-VIVO™ 15, id-dilwizzjonijiet serjali tas-soluzzjonijiet ewlenin ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanzi kimiċi tat-test isiru b'fattur ta' dilwizzjoni ta' tnejn (ara l-Appendiċi 3.5) bl-użu ta' blokk tal-assaġġ b'96 bwejra (eż. Costar Cat#EW-01729-03). Imbagħad, 50 µl/bwejra tas-soluzzjoni dilwita tiżdied ma' 50 µl tas-sospensjoni taċ-ċelloli fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. B'hekk, għal sustanzi kimiċi tat-test li huma solubbli f'X-VIVO ™ 15, il-konċentrazzjonijiet finali tas-sustanzi kimiċi tat-test ivarjaw minn 0,002 sa 2 mg/ml (Appendiċi 3.5). Għal sustanzi kimiċi tat-test li mhumiex solubbli f'X-VIVO ™ 15 f'20 mg/ml, fatturi ta' dilwizzjoni li jvarjaw minn 2 sa 2^{10} biss jiġu determinati, għalkemm il-konċentrazzjonijiet finali attwali tas-sustanzi kimiċi tat-test jibqgħu inċerti u jiddependu mill-konċentrazzjoni saturata tas-sustanzi kimiċi tat-test fl-X-VIVO ™ 15.

19. F'sessjonijiet tat-test sussegwenti (jiġifieri t-tieni, it-tielet u r-raba' repliki), is-soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ issir fil-konċentrazzjoni 4 darbiet ogħla mill-konċentrazzjoni tal-vijabbiltà taċ-ċelloli 05 (CV05; l-anqas konċentrazzjoni li fiha l-Inh-GAPLA ssir < 0,05) fl-ewwel esperiment. Jekk Inh-GAPLA ma tonqosx f'livell anqas minn 0,05 fl-ogħla konċentrazzjoni fl-ewwel sessjoni, is-soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ 15 issir fl-ogħla konċentrazzjoni tal-ewwel sessjoni. Il-konċentrazzjoni ta' CV05 tiġi kkalkolata bid-diviżjoni tal-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija fl-ewwel sessjoni b'fattur ta' dilwizzjoni għas-CV05 (X) (fattur ta' dilwizzjoni CV05 (X); il-fattur ta' dilwizzjoni meħtieġ biex tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija għas-CV05) (ara l-Appendiċi 3.5). Għal sustanzi tat-test mhux solubbli f'X-VIVO f'20 mg/ml, is-CV05 tiġi determinata bil-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija × 1/X. Għas-sessjonijiet 2 sa 4, it-tieni soluzzjoni ewlenija titħejja bħala 4 × CV05 (Appendiċi 3.5).

20. Dilwizzjonijiet serjali tat-tieni soluzzjonijiet ewlenin ta' X-VIVO™ 15 jitħejjew b'fattur ta' dilwizzjoni ta' 1,5 bl-użu ta' blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Imbagħad, 50 µl/bwejra tas-soluzzjoni dilwita tiżdied ma' 50 µl tas-sospensjoni taċ-ċelloli fil-bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. Kull konċentrazzjoni ta' kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Imbagħad il-kampjuni jitħalltu fuq xejker tal-pjastri u jiġu inkubati għal 16-il siegħa f'37°C u f'5 % CO_2, u wara dan titkejjel l-attività tal-luċiferaži kif deskritt hawn taħt.

21. Il-kontroll b'solvent hu t-taħlita ta' 50 µl/bwejra ta' X-VIVO™ 15 u 50 µl/bwejra ta' sospensjoni taċ-ċelloli fl-RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS.

22. Il-kontroll pożittiv rakkomandat hu 4-NBB. 20 mg ta' 4-NBB jitħejja f'tubu tal-mikrofuġju ta' 1,5-ml, li miegħu jiżdied sa 1 ml X-VIVO™ 15. It-tubu jiġi vortiċifikat bis-saħħa u jitħawwad fuq rotor b'veloċità massima ta' 8 rpm għal tal-anqas 30 min. Wara ċ-ċentrifugazzjoni f'20000g għal 5 min, is-supernatant jiġi dilwit b'fattur ta' 4 b'X-VIVO™ 15, u 500 µl tas-supernatant dilwit jiġi trasferit fi bwejra fi blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Is-supernatant dilwit jiġi dilwit aktar b'X-VIVO™ 15 f'fatturi ta' 2 u 4, u tiżdied 50 µl tas-soluzzjoni ma' 50 µl tas-sospensjoni taċ-ċelloli THP-G8 fil-bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċat b'96 bwejra (Appendiċi 3.6). Kull konċentrazzjoni tal-kontroll pożittiv għandha tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Il-pjastra titheżżeż fuq xejker tal-pjastri, u tiġi inkubata f'inkubatur tas-CO_2 għal 16-il siegħa (37°C, 5 % CO_2), u wara dan l-attività tal-luċiferaži titkejjel kif deskritt fil-paragrafu 29.

23. Il-kontroll negattiv rakkomandat hu l-LA. 20 mg LA mħejji f'tubu tal-mikrofuġju ta' 1,5-ml, li miegħu jiżdied sa 1 ml (20 mg/ ml) X-VIVO™ 15. Soluzzjoni ta' 20 mg/ml LA tiġi dilwita b'fattur ta' 5 b'X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl ta' din is-soluzzjoni 4 mg/ml LA tiġi trasferita fi bwejra ta' blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Din is-soluzzjoni tiġi dilwita b'fattur ta' 2 b'X-VIVO™ 15 u mbagħad terġa' tiġi dilwita b'fattur ta' 2 biex tipproduċi soluzzjonijiet ta' 2 mg/ml u ta' 1 mg/ml. 50 µl ta' dawn it-tliet soluzzjonijiet u l-kontroll b'veikolu (X-VIVO™ 15) jiżdiedu ma' 50 µl ta' sospensjoni taċ-ċelloli THP-G8 fil-bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. Kull konċentrazzjoni tal-kontroll negattiv tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Il-pjastra titheżżeż fuq xejker tal-pjastri, u tiġi inkubata f'inkubatur tas-CO_2 għal 16-il siegħa (37°C, 5 % CO_2), u wara dan l-attività tal-luċiferaži titkejjel kif deskritt fil-paragrafu 29.

24. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi jew negattivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli.

25. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn bwejriet minn sustanzi kimiċi tat-test, eż. billi l-pjastra tiġi ssiġillata qabel l-inkubazzjoni bis-sustanzi kimiċi tat-test.

26. Is-sustanzi kimiċi tat-test u l-kontroll b'solvent jeħtieġu minn tnejn sa erba' sessjonijiet biex jinkiseb tbassir pożittiv jew negattiv (ara t-Tabella 2). Kull sessjoni ssir f'ġurnata differenti b'soluzzjoni ewlenija ġdida ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanzi kimiċi tat-test u ta' ċelloli miġbura indipendentement. Iċ-ċelloli jistgħu jkunu ġejjin mill-istess passaġġ.

Kejlijiet tal-attività tal-luċiferaża

27. Il-luminexxenza titkejjel bl-użu ta' luminometru tal-mikropjastri b'96 bwejra mgħammra b'filtri ottiċi, eż. Phelios (ATTO, Tokyo, il-Ġappun), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, il-Ġermanja) u s-serje ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, l-Istati Uniti). Il-luminometru jrid jiġi kalibrat għal kull test biex tiġi żgurata riproduċibbiltà (19). Il-luċiferażijiet rikombinanti li jemettu l-oranġjo u l-aħmar huma disponibbli għal dan il-kalibrar.

28. 100µl tar-reaġent tal-assaġġ tal-Luċiferaża msaħħan bil-lest Tripluc® (Tripluc) jiġi trasferit f'kull bwejra tal-pjastra li jkun fiha s-sospensjoni taċ-ċelloli trattata b'sustanza kimika jew mingħajr. Il-pjastra titħeżżeż għal 10 min f'temperatura ambjentali ta' madwar 20°C. Il-pjastra titqiegħed fil-luminometru biex titkejjel l-attività tal-luċiferaża. Il-bijoluminexxenza titkejjel għal 3 sek kull waħda fin-nuqqas (F0) u fil-preżenza (F1) tal-filtru ottiku. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni għall-użu ta' ssettjar alternattiv, eż. skont il-mudell tal-luminometru użat.

29. Il-parametri għal kull konċentrazzjoni jiġu kkalkolati mill-valuri mkejla, eż. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, ±SD medja tal-IL8LA, ±SD medja tal-GAPLA, ±SD medja tal-nIL8LA, ±SD medja tal-Ind-IL8LA, ±SD medja tal-Inh-GAPLA, u l-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA. Id-definizzjonijiet tal-parametri użati f'dan il-paragrafu huma pprovduti fl-Appendiċijiet 3.1 u 3.4.

30. Qabel il-kejl, id-diskriminazzjoni tal-kulur f'assaġġi indikatur b'diversi kuluri ġeneralment tinkiseb bl-użu ta' detetturi (luminometru u apparati għall-qari tal-pjastri) mgħammra b'filtri ottiċi, bħal filtri sharp-cut (long-pass jew short-pass) jew filtri band-pass. Il-koeffiċjenti ta' trażmissjoni tal-filtri għal kull kulur tas-sinjali tal-bijoluminexxenza għandhom jiġu kalibrati qabel kull test, skont l-Appendiċi 3.2.

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-*Data*

31. Il-kriterji għal deċiżjoni pożittiva/negattiva jeħtieġu li f'kull sessjoni:

— tbassir tal-assaġġ IL-8 Luc jiġi ġġudikat pożittiv jekk sustanza kimika tat-test ikollha Ind-IL8LA ≥ 1,4 u l-limitu inferjuri tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA ≥ 1,0

— tbassir tal-assaġġ IL-8 Luc jiġi ġġudikat negativ jekk sustanza kimika tat-test ikollha Ind-IL8LA < 1,4 u/jew il-limitu inferjuri tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA < 1,0

Mudell ta' tbassir

32. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jipprovdu żewġ riżultati pożittivi minn fost l-1el, it-2ni, it-3et jew ir-4a sessjoni jiġu identifikati bħala pożittivi filwaqt li dawk li jagħtu tliet riżultati negattivi minn fost l-1el, it-2ni, it-3et jew ir-4a sessjoni jiġu identifikati bħala supponuti negattivi (Tabella 2). Fost is-sustanzi kimiċi supponuti negattivi, is-sustanzi kimiċi li jiġu dissolti f'20 mg/ml ta' X-VIVO™ 15 huma ġġudikati bħala negattivi, filwaqt li s-sustanzi kimiċi li ma jiġux dissolti f'20 mg/ml ta' X-VIVO™ 15 ma għandhomx jiġu kkunsidrati (Figura 1).

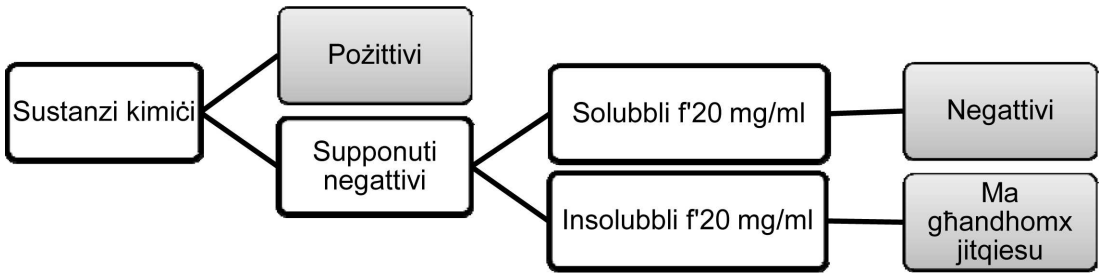
Tabella 2

Kriterji għall-identifikazzjoni tal-pożittivi u tas-supponuti negattivi

L-1el sessjoni	It-2ni sessjoni	It-3et sessjoni	Ir-4a sessjoni	Tbassir finali
Pożittiv	Pożittiv	–	–	Pożittiv
	Negattiv	Pożittiv	–	Pożittiv
		Negattiv	Pożittiv	Pożittiv
			Negattiv	Supponut Negattiv
Negattiv	Pożittiv	Pożittiv	–	Pożittiv
		Negattiv	Pożittiv	Pożittiv
			Negattiv	Supponut Negattiv
	Negattiv	Pożittiv	Pożittiv	Pożittiv
			Negattiv	Supponut Negattiv
		Negattiv	–	Supponut Negattiv

Figura 1

Mudell ta' tbassir għall-ġudizzju finali



Kriterji ta' aċċettazzjoni

33. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża l-assaġġ IL-8 Luc:

— Ind-IL8LA għandha tkun aktar minn 5,0 f'tal-anqas konċentrazzjoni waħda tal-kontroll pożittiv, 4-NBB, f'kull sessjoni.

— Ind-IL8LA għandha tkun anqas minn 1,4 fi kwalunkwe konċentrazzjoni tal-kontroll negattiv, aċidu lattiku, f'kull sessjoni.

— Id-*data* mill-pjastri li għalihom il-GAPLA tal-bwejriet tal-kontroll b'ċelloli u bi Tripluc iżda mingħajr sustanzi kimiċi tkun anqas minn 5 darbiet dik ta' bwejra li jkun fiha l-medium tat-test biss (50 µl/bwejra RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS u 50 µl/bwejra X-VIVO™ 15) għandha tiġi rifjutata.

— Id-*data* mill-pjastri li għalihom l-Inh-GAPLA tal-konċentrazzjonijiet kollha tas-sustanzi kimiċi tat-test jew tal-kontroll tkun anqas minn 0,05 għandha tiġi rifjutata. F'dan il-każ, l-ewwel test għandu jiġi ripetut biex l-ogħla konċentrazzjoni finali tat-test ripetutt tkun l-anqas konċentrazzjoni finali tat-test preċedenti.

Rapport tat-test

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

Sustanzi kimiċi tat-test

Sustanza monokostitwenti:

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

— It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Is-solubbiltà f'X-VIVO™ 15. Għal sustanzi kimiċi li huma insolubbli f'X-VIVO™ 15, jekk jiġux osservati preċipitazzjoni jew flotazzjoni wara ċ-ċentrifugazzjoni;

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test jekk ma jintużax X-VIVO™ 15.

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita:

— Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;

— Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Is-solubbiltà f'X-VIVO™ 15. Għal sustanzi kimiċi li huma insolubbli f'X-VIVO™ 15, jekk jiġux osservati preċipitazzjoni jew flotazzjoni wara ċ-ċentrifugazzjoni;

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test jekk ma jintużax X-VIVO™ 15.

Kontrolli

Kontroll pożittiv:

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, ħin);

— Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv:

— Identifikazzjoni kimika, bħall-isem/ismijiet IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, u/jew identifikaturi oħrajn;

— Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

— Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintużaw kontrolli negattivi oħra li ma jkunux fost dawk imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;

— Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;

— Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;

Il-kundizzjonijiet tat-test

— L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;

— Deskrizzjoni tat-test użat;

— Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-faċilità mnejn inkisbet);

— In-numru tal-lott u l-oriġini tal-FBS, isem il-fornitur, in-numru tal-lott tal-pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra, u n-numru tal-lott tar-reaġent Tripluc;

— In-numru ta' passaġġi u d-densità taċ-ċelloli użati għall-ittestjar;

— Il-metodu ta' għadd taċ-ċelloli għat-tiżrigħ qabel l-ittestjar u l-miżuri meħudin biex tiġi żgurata distribuzzjoni omoġena tan-numru ta' ċelloli;

— Il-luminometru użat (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrument, is-substrat ta' luċiferaži użat, u wiri tal-kejlijiet ta' luminexxenza xierqa fuq il-bażi tat-test tal-kontroll deskritt fl-Appendiċi 3.2;

— Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju biex iwettaq it-test (eż. billi jiġu ttestjati s-sustanzi ta' profiċjenza) jew biex tintwera prestazzjoni riproduċibbli tat-test matul iż-żmien.

Il-proċedura tat-test

— In-numru ta' repliki u ta' sessjonijiet imwettqa;

— Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, il-proċedura ta' applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment (jekk ikunu differenti minn dawk rakkomandati);

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' deċiżjoni użati;

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

— Il-kejlijiet tal-IL8LA u tal-GAPLA;

— Il-kalkoli għall-nIL8LA, għall-Ind-IL8LA, u għall-Inh-GAPLA;

— L-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA;

— Graff li turi l-kurvi ta' doża-rispons għall-induzzjoni tal-attività tal-luċiferaży u għall-vijabbiltà;

— Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-riżultati

— Diskussjoni tar-riżultati miksuba bl-assaġġ IL-8 Luc;

— Kunsiderazzjoni tar-riżultati tal-assaġġ fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, u Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, u Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, u Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, u Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, u Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016). *Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists,* OECD Publishing, Pariġi. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, u Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, u Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, u Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Pariġi, Franza

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Pariġi, Franza.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Disponibbli fuq. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, u Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Pariġi, Franza.

(21) In-Nazzjonijiet Uniti (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Appendiċi 3.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' konkordanza biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (16).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): Sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (22).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

CV05: Il-vijabbiltà taċ-ċelloli 05, jiġifieri l-konċentrazzjoni minima li fiha s-sustanzi kimiċi juru anqas minn 0,05 tal-Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-Ind-IL8LA. Ara Ind-IL8LA għad-definizzjoni.

GAPLA: Attività tal-Luċiferaži tal-Luċiferaži Ħamra Stabbli (SLR) (λmass = 630 nm), regolata mill-promotur tal-GAPDH u turi l-vijabbiltà taċ-ċelloli u n-numru ta' ċelloli vijabbli.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), il-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-ħtieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

Il-SLR-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-Inh-GAPLA. Ara Inh-GAPLA għad-definizzjoni.

IL-8 (Interlewkina-8): Ċitokina derivata minn ċelloli endoteljali, minn fibroblasti, minn keratinoċiti, minn makrofagi, u minn monoċiti li tikkawża kemotassi tan-newtrofili u tal-linfoċiti taċ-ċelloli-T.

IL8LA: Attività tal-Luċiferaži tal-Luċiferaži Oranġjo Stabbli (SLO) (λmass = 580 nm), regolata mill-promotur tal-IL-8.

Ind-IL8LA: Induzzjoni ta' drabi tal-nIL8LA. Tinkiseb bid-diviżjoni tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi b'dik ta' ċelloli THP-G8 mhux stimolati u tirrappreżenta l-induzzjoni tal-attività tal-promotur tal-IL-8 mis-sustanzi kimiċi.

Inh-GAPLA: Inibizzjoni tal-GAPLA. Tinkiseb bid-diviżjoni tal-GAPLA tat-THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi b'GAPLA ta' THP-G8 mhux trattati u tirrappreżenta ċ-ċitotossiċità tas-sustanzi kimiċi.

Limitu minimu ta' induzzjoni (MIT): l-anqas konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tissodisfa l-kriterji pożittivi

Taħlita: Taħlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew aktar.

Sustanza monokostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha kostitwent ewlieni wieħed ikun preżenti għal tal-anqas 80 % (w/w).

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha aktar minn wieħed mill-kostitwenti ewlenin ikunu preżenti f'konċentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn taħlita u sustanza multikostitwenti hi li taħlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew aktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hi r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

nIL8LA: L-attività tal-luċiferaži SLO li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8 (IL8LA) normalizzata bl-attività tal-luċiferaži SLR li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH (GAPLA). Din tirrappreżenta l-attività promotur tal-IL-8 wara li tikkunsidra l-vijabbiltà taċ-ċelloli jew in-numru ta' ċelloli.

nSLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-nIL8LA. Ara nIL8LA għad-definizzjoni.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Biex jiġi żgurat li l-varjabbiltà fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Preapteni: Sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika.

Proapteni: Sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jeħilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (16).

Affidabbiltà: Kejlijiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorarji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (16).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (16).

SLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-IL8LA. Ara IL8LA għad-definizzjoni.

SLR-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-GAPLA. Ara GAPLA għad-definizzjoni.

Kontroll b'solvent/veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test ħlief tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bażi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbliment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategoriċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (16).

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksuba bi kwalunkwe proċess ta' manifattura tal-produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabbiltà tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, iżda eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabbiltà tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha.

Tensjoattiv: Imsejjaħ ukoll aġent tensjoattiv, dan huwa sustanza, bħal deterġent, li tista' tnaqqas it-tensjoni tas-superfiċje ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtella' r-ragħwa jew jippenetra solidi; hu magħruf ukoll bħala aġent li jxarrab. (TG437)

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu.

THP-G8: Linja ta' ċelloli indikatur IL-8 użata fl-assaġġ IL-8 Luc. Il-linja ta' ċelloli umana qisha makrofagu, THP-1, ġiet transfettata fil-ġeni tal-luċiferaži SLO u SLR taħt il-kontroll tal-promoturi tal-IL-8 u tal-GAPDH, rispettivament.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emerġenza) u l-ambjent (21).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Metodu ta' ttestjar validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit.

Appendiċi 3.2

IL-PRINĊIPJU TAL-KEJL TAL-ATTIVITÀ TAL-LUĊIFERAŻI U D-DETERMINAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENTI TA' TRAŻMISSJONI TAL-FILTRU OTTIKU GĦALL-SLO U GĦALL-SLR

Sistema ta' Assaġġ b'Diversi Indikaturi -Tripluc- tista' tintuża b'luminometru tat-tip tal-mikropjastri b'sistema ta' detezzjoni b'diversi kuluri, li jista' jitqabbdilha filtru ottiku (eż. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Il-filtru ottiku użat fil-kejl hu filtru long jew short pass ta' 600–620 nm, jew filtru band pass ta' 600–700 nm.

Il-kejl ta' luċiferażijiet b'żewġ kuluri b'filtru ottiku.

Dan hu eżempju bl-użu ta' Phelios AB-2350 (ATTO). Dan il-luminometru hu mgħammar b'filtru long pass ta' 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, Filtru 1) għall-qsim tal-luminexxenza tal-SLO (λmass = 580 nm) u tal-SLR (λmass = 630 nm).

Biex jiġu determinati l-koeffiċjenti ta' tarżmissjoni tal-LP ta' 600 nm, l-ewwel, bl-użu tal-enzimi tal-luċiferaži SLO u SLR purifikati, kejjel i) l-intensità tal-bijoluminexxenza tal-SLO u tal-SLR mingħajr filtru (F0), ii) l-intensità tal-bijoluminexxenza tal-SLO u tal-SLR li tgħaddi minn LP ta' 600 nm (Filgru 1), u iii) ikkalkola l-koeffiċjenti ta' trażmissjoni tal-LP ta' 600 nm għall-SLO u għall-SLR elenkati hawn taħt.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$=\kappa O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Meta l-intensità tal-SLO u tal-SLR fil-kampjun tat-test jiġu definiti bħala O u R, rispettivament, i) l-intensità tad-dawl mingħajr filtru (kollox ottiku) F0 u ii) l-intensità tad-dawl li jittrażmetti mil-LP ta' 600 nm (Filtru 1) F1 jiġu deskritti kif muri hawn taħt.

F0=O+R

$F1=\kappa O_{R60}$ x O + κR_{R60} x R

Dawn il-formuli jistgħu jiġu spjegat kif ġej:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Imbagħad bl-użu tal-fatturi ta' trażmittenza kkalkolati (κO_{R60} u κR_{R60}) u l-F0 u l-F1 imkejla, tkun tista' tikkalkola l-valur O u R kif ġej:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Il-materjali u l-metodi għad-determinazzjoni tal-fattur ta' trażmittanza

(1) Reaġenti

Enzimi tal-luċiferaży purifikati individwali:

Enzima tal-SLO purifikata lijofilizzata

Enzima tal-SLR purifikata lijofilizzata

(li għax-xogħol ta' validazzjoni nkisbu mill-GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, il-Ġappun mal-linja ta' ċelloli THP-G8)

Reaġent tal-assaġġ:

Reaġent tal-assaġġ tal-Luċiferaży Tripluc® (pereżempju minn TOYOBO Cat#MRA-301)

Medium: għall-assaġġ tal-luċiferaży (30 ml, maħżuna f'2 – 8°C)

Reaġent	Konċ.	Konċ. finali fil-medium	Ammont meħtieġ
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Tħejjija tas-soluzzjoni tal-enzimi

Iddisolvi l-enzima tal-luċiferaży purifikata lijofilizzata f'tubu billi żżid 200 µl ta' 10 ~ 100 mM Tris/HCl jew Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) supplimentat b'10 % (w/v) gliċerol, iddividi s-soluzzjoni tal-enzima f'alikwoti ta' 10 µl f'tubi li jintremew ta' 1,5 ml u aħżinhom fi friżer f'-80°C. Is-soluzzjoni tal-enzima ffriżata tista' tintuża sa sitt xhur wara. Meta tintuża, żid 1 ml medium għall-assaġġ tal-luċiferaży (RPMI-1640 b'10 % FBS) f'kull tubu li jkun fih is-soluzzjonijiet tal-enzimi (soluzzjoni tal-enzimi dilwita) u żommhom fuq is-silġ biex tipprevjeni d-diżattivazzjoni.

(3) Kejl tal-bijoluminexxenza

Ħoll ir-reaġent tal-assaġġ tal-Luċiferaży Tripluc® (Tripluc) u żommu f'temperatura ambejntali f'banjumarija jew f'temperatura tal-arja ambjentali. Ixgħel il-luminometru 30 min qabel ma tibda l-kejl biex tħalli l-fotomoltiplikatur jistabbilizza. Ittrasferixxi 100 µl tas-soluzzjoni tal-enzima dilwita fi pjastra sewda b'96 bwejra (qiegħ ċatt) (il-kampjun ta' riferiment tal-SLO għal #B1, #B2, #B3, il-kampjun ta' riferiment tal-SLR għal #D1, #D2, #D3). Imbagħad ittrasferixxi 100 µl ta' Tripluc imsaħħan minn qabel f'kull bwejra tal-pjastra li jkun fiha s-soluzzjoni tal-enzima dilwita bl-użu ta' pipetman. Ħawwad il-pjastra għal 10 min f'temperatura ambjentali (madwar 25°C) billi tuża xejker tal-pjastri. Neħħi l-bżieżaq mis-soluzzjonijiet fil-bwejriet jekk jitilgħu. Qiegħed il-pjastra fil-luminumetru biex tkejjel l-attività tal-luċiferaży. Il-bijoluminexxenza titkejjel għal 3 sek kull waħda fin-nuqqas (F0) u fil-preżenza (F1) tal-filtru ottiku.

Il-koeffiċjent ta' trażmissjoni tal-filtru ottiku ġie kkalkolat kif ġej:

Koeffiċjent ta' trażmissjoni (SLO (κO_{R60}))= (#B1 tal-F1+ #B2 tal-F1+ #B3 tal-F1) / (#B1 tal-F0+ #B2 tal-F0+ #B3 tal-F0)

Koeffiċjent ta' trażmissjoni (SLR (κR_{R60}))= (#D1 tal-F1+ #D2 tal-F1+ #D3 tal-F1) / (#D1 tal-F0+ #D2 tal-F0+ #D3 tal-F0)

Il-fatturi kkalkolati tat-trażmittenza jintużaw għall-kejlijiet kollha eżegwiti bl-użu tal-istess luminometru.

Kontroll tal-kwalità tat-tagħmir

Għandhom jintużaw il-proċeduri deskritti fil-protokoll IL-8 Luc (18).

Appendiċi 3.3

SUSTANZI TA' PROFIĊJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu t-tbassir mistenni tal-assaġġ IL-8 Luc għad-disa' sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas tmienja mid-disa' sustanzi ta' profiċjenza (magħżula biex jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi għall-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda). Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bl-assaġġ IL-8 Luc. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għall-assaġġ IL-8 Luc (6) (1).

Tabella 1

Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bl-assaġġ IL-8 Luc

Sustanzi ta' profiċjenza	Numru tas-CAS	Stat	Solubbiltà f X-VIVO15 f'20 mg/ml	Tbassir *in vivo* (1)	Tbassir tal-IL-8 Luc (2)	Medda ta' riferiment (μg/ml) (3)	
						CV_{05} (4)	IL-8 Luc MIT (5)
2,4-Dinitroklorobenżen	97-00-7	Solidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Estrem)	Pożittiv	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldeid	50-00-0	Likwidu	Solubbli	Sensitizzatur (B'saħħtu)	Pożittiv	9-30	4-9
2-Merkaptobenżotjażol	149-30-4	Solidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Moderat)	Pożittiv	250-290	60-250
Etilendiammina	107-15-3	Likwidu	Solubbli	Sensitizzatur (Moderat)	Pożittiv	500-700	0,1-0,4
Dimetakilat tal-Etileneglikol	97-90-5	Likwidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Dgħajjef)	Pożittiv	>2000	0,04-0,1
4-Allilanisol (Estragol)	140-67-0	Likwidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Dgħajjef)	Pożittiv	>2000	0,01-0,07
Sulfat tal-istreptomiċina	3810-74-0	Solidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000
Isopropanol	67-63-0	Likwidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000

Abbrevjazzjonijiet: Nru tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi
(1) Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (19).
(2) Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (1) (6).
(3) CV_{05} u IL-8 Luc MIT ġew ikkalkolati bl-uż tas-solubbiltà fl-ilma mogħtija minn EPI Suite™.
(4) CV_{05}: il-konċentrazzjoni minima li fiha s-sustanzi kimiċi juru anqas minn 0,05 tal-Inh-GAPLA.
(5) MIT: l-anqas konċentrazzjonijiet li fihom sustanza kimika tissodisfa l-kriterji pożittivi.

Appendiċi 3.4

INDIĊIJIET U KRITERJI TA' ĠUDIZZJU

nIL8LA (nSLO-LA)

Ir-ripetizzjoni nru j (j = 1-4) tal-konċentrazzjoni nru i (i = 0-11) titkejjel għall-IL8LA (SLO-LA) u għall-GAPLA (SLR-LA) rispettivament. L-IL8LA normalizzata, imsejħa nIL8LA (nSLO-LA), u hi definita bħala:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Din hi l-unità bażika tal-kejl f'dan l-assaġġ.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Iż-żieda ta' drabi tal-nIL8LA medja (nSLO-LA) għar-ripetizzjoni tal-konċentrazzjoni nru i mqabbla magħha fil-konċentrazzjoni 0, Ind-IL8LA, hi l-kejl primarju ta' dan l-assaġġ. Dan il-proporzjon hu miktub bil-formula li ġejja:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\}/\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\}$$

Il-laboratorju prinċipali ppropona li valur ta' 1,4 jikkorrispondi għal riżultat pożittiv għas-sustanza kimika ttestjata. Dan il-valur hu bbażat fuq l-investigazzjoni tad-*data* storika tal-laboratorju prinċipali. It-tim ta' ġestjoni tad-*data* mbagħad uża dan il-valur fil-fażijiet kollha tal-istudju ta' validazzjoni. L-eżitu primarju, Ind-IL8LA, hu l-proporzjon ta' żewġ medji aritmetiċi kif murija fl-ekwazzjoni.

Intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (CI ta' 95 %)

L-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (CI ta' 95 %) fuq il-bażi tal-proporzjon jista' jiġi stmat li juri l-preċiżjoni ta' dan il-kejl tal-eżitu primarju. Il-limitu inferjuri tas-CI ta' 95 % ≥ 1 jindika li l-nIL8LA bil-konċentrazzjoni nru i hi ferm akbar minn dik bil-kontroll b'solvent. Hemm diversi modi biex jinbena s-CI ta' 95 %. Aħna użajna l-metodu magħruf bħala t-teorema ta' Fieller f'dan l-istudju. Din it-teorima tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tinkiseb mill-formula li ġejja:

$$[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}],$$

Fejn

$$A = \overline{x}_0^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \overline{x} \times \overline{y}$$

$C = \overline{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}$, and $n_0 = 4$

$\overline{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

hi l-perċentil ta' 97,5 tad-distribuzzjoni ċentrali t bil-ν tal-grad ta' libertà, fejn

$$\nu = (\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}})/\{(\frac{sd_0^2}{n_0})^2/(n_0 - 1) + (\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}})/(n_{yi} - 1)\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

L-Inh-GAPLA hi l-proporzjon tal-GAPLA medja (SLR-LA) għar-ripetizzjoni tal-konċentrazzjoni nru i meta mqabbla ma' dik bil-kontroll b'solvent, u din tinkiteb permezz ta'

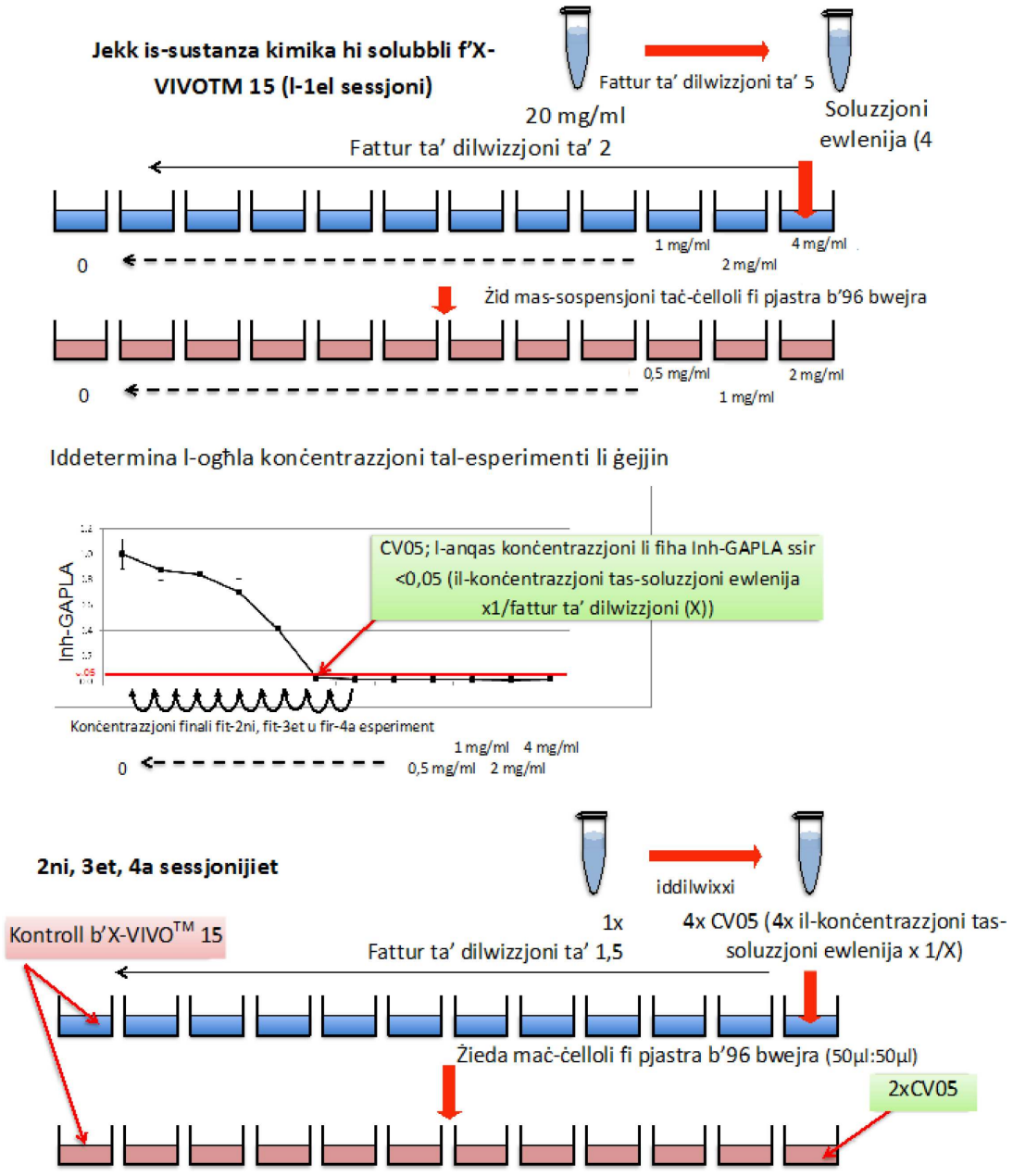
$$Inh - GAPLA_i = \{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij}\}/\{(1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

Peress li l-GAPLA hi d-denominatur tal-nIL8LA, valur estremament żgħir jikkawża varjazzjoni kbira fl-nIL8LA. Għaldaqstant, valuri tal-Ind-IL8LA b'valur estremament żgħir tal-Inh-GAPLA (anqas minn 0,05) jistgħu jitqiesu li għandhom preċiżjoni baxxa.

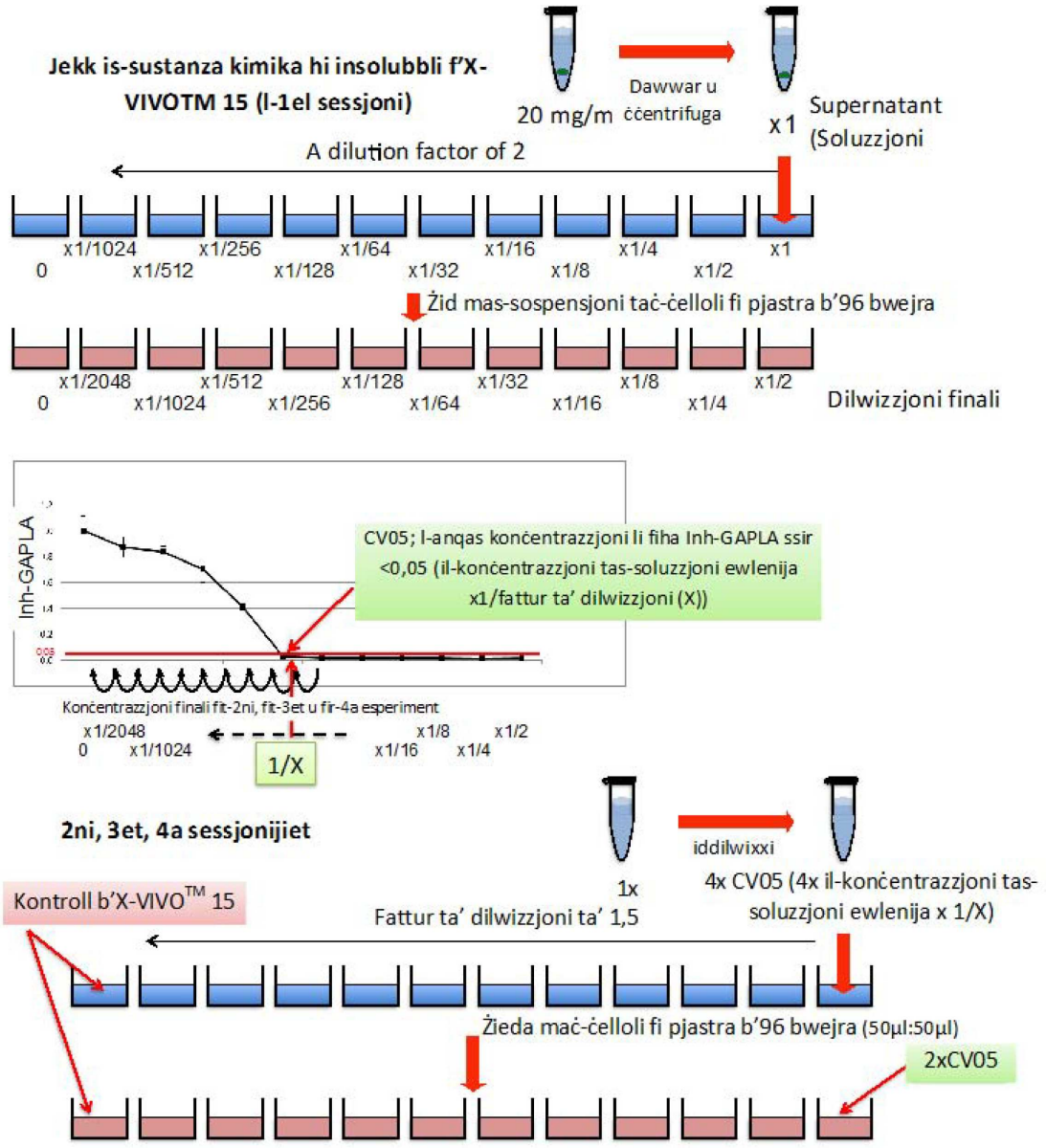
Appendiċi 3.5

L-ISKEMA TAL-METODI BIEX JIĠU DISSOLTI SUSTANZI KIMIĊI GĦALL-ASSAĠĠ IL-8 LUC.

(a) Għal sustanzi kimiċi dissolti f'X-VIVO™ 15 f'20 mg/ml

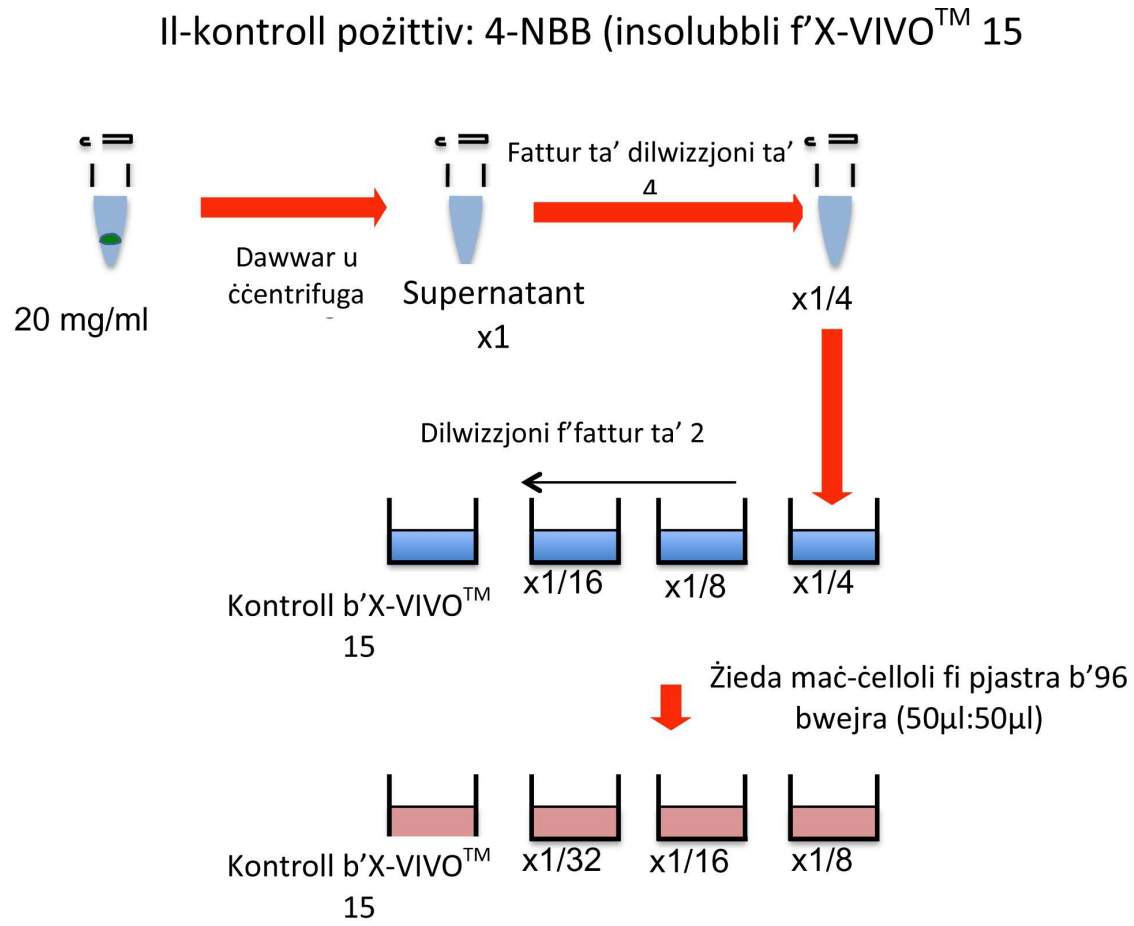


(b) Għal sustanzi kimiċi insolubbli f'X-VIVO™ 15 f'20 mg/ml



Appendiċi 3.6

L-ISKEMA TAL-METODU BIEX JIĠI DISSOLT 4-NBB GĦALL-KONTROLL POŻITTIV TAL-ASSAĠĠ IL-8 LUC.



"

(9) Fil-Parti C, jiżdiedu l-Kapitoli li ġejjin:

"C.52 **TEST TAR-RIPRODUZZJONI TA' ĠENERAZZJONI ESTIŻA WAĦDA TA' MEDAKA (MEOGRT)**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 240 tal-OECD (2015). It-Test ta' Ġenerazzjoni Estiża Waħda ta' Medaka (MEOGRT) jiddeskrivi metodu ta' ttestjar komprensiv ibbażat fuq ħut espost fuq diversi ġenerazzjonijiet biex jagħti *data* rilevanti għall-valutazzjoni tal-periklu u tar-riskju ekoloġiċi tas-sustanzi kimiċi, inklużi sustanzi kimiċi interferenti endokrinali suspettati (EDCs). L-esponiment fil-MEOGRT jibqa' sat-tifqis (sa ġimagħtejn wara l-fertilizzazzjoni, wpf) fit-tieni ġenerazzjoni (F2). Ikunu meħtieġa investigazzjonijiet addizzjonali biex tiġi ġustifikata l-utilità tal-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2 lil hinn mit-tifqis; għalissa m'hemmx biżżejjed informazzjoni biex jiġu pprovduti l-kundizzjonijiet jew il-kriterji rilevanti għall-ġustifikazzjoni tal-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2. Madankollu, dan il-metodu ta' ttestjar jista' jiġi aġġornat hekk kif jiġu kkunsidrati informazzjoni u *data* ġodda. Pereżempju, gwida dwar l-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2 permezz tar-riproduzzjoni tista' tkun potenzjalment siewja f'ċerti ċirkustanzi (eż. sustanzi kimiċi b'potenzjal għoli ta' bijokonċentrazzjoni jew b'indikazzjonijiet ta' effetti transġenerazzjonali f'unitajiet tassonomiċi oħra). Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża biex jiġu evalwati l-effetti kroniċi potenzjali tas-sustanzi kimiċi, inklużi sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali, fuq il-ħut. Il-metodu jixħet enfasi primarja fuq l-effetti rilevanti potenzjali fuq il-popolazzjoni (jiġifieri, impatti avversi fuq is-sopravivenza, l-iżvilupp, it-tkabbir u r-riproduzzjoni) għall-kalkolu ta' Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) jew Konċentrazzjoni ta' Effett (Ecx), għalkemm ta' min jinnota li l-approċċi tal-ECx rarament ikunu xierqa għal studji kbar ta' dan it-tip fejn iż-żieda tan-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test biex tkun tista' tiġi determinata l-ECx mixtieqa tista' tkun imprattika, u dan jista' jikkawża wkoll ħassib sinifikanti relatat mal-benessri tal-annimali minħabba n-numru kbir ta' annimali użati. Għal sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux valutazzjoni fuq "diversi ġenerazzjonijiet" jew sustanzi kimiċi li mhumiex sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali, metodi ta' ttestjar oħra jaf ikunu aktar adattati (1). Il-medaka hi l-ispeċi xierqa għall-użu f'dan il-metodu ta' ttestjar, fid-dawl taċ-ċiklu tal-ħajja qasir tagħha u tal-possibbiltà li jiġi determinat is-sess ġenetiku tagħha (2), li hu meqjus komponent kritiku f'dan il-metodu ta' ttestjar. Il-metodi speċifiċi u l-punti ta' tmiem osservazzjonali spjegati f'dan il-metodu huma applikabbli għall-medaka biss. Speċijiet oħra ta' ħut żgħir (eż. żebra) jistgħu jkunu adattati għal protokoll tat-test simili.

2. Dan il-metodu ta' ttestjar ikejjel diversi punti ta' tmiem bijoloġiċi. Tingħata enfasi primarja lill-effetti avversi potenzjali fuq il-parametri rilevanti għall-popolazzjoni inklużi s-sopravivenza, l-iżvilupp gross, it-tkabbir u r-riproduzzjoni. It-tieni nett, biex tiġi pprovduta informazzjoni mekkanistika u tiġi pprovduta konnessjoni bejn ir-riżultati minn tipi oħra ta' studji fuq il-post u fil-laboratorju, fejn ikun hemm evidenza *a posteriori* li sustanza kimika jkollha attività potenzjali ta' interferenza endokrinali (*eż.* attività androġenika jew estroġenika f'testijiet u f'assaġġi oħra), informazzjoni siewja oħra tinkiseb bil-kejl tal-mRNA tal-*vitelloġenina* (*vtg)* (jew il-proteina tal-vitelloġenina, il-VTG), tal-karatteristiċi sesswali sekondarji (SSC) fenotipiċi relatati mas-sess ġenetiku, u bl-evalwazzjoni tal-istopatoloġija. Ta' min jinnota li jekk sustanza kimika tat-test jew il-metaboliti tagħha ma jkunux suspettati li jkunu EDCs, jaf ma jkunx hemm bżonn li jitkejlu dawn il-punti ta' tmiem sekondarji u jaf ikun aktar xieraq li jintużaw studji anqas intensivi fl-użu ta' riżorsi u ta' annimali (1). Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Minħabba n-numru limitat ta' sustanzi kimiċi ttestjati u ta' laboratorji involuti fil-validazzjoni ta' dan l-assaġġ kemxejn kumpless, hu antiċipat li la jkun hemm numru suffiċjenti ta' studji disponibbli biex jiġi żgurat l-impatt ta' dan id-disinn il-ġdid tal-istudju, il-metodu ta' ttestjar jiġi rieżaminat u, jekk ikun hemm bżonn, rivedut, fid-dawl tal-esperjenza miksuba. Id-*data* tista' tintuża fil-Livell 5 tal-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (3). Il-metodu ta' ttestjar jibda bl-esponiment ta' ħut adult (il-ġenerazzjoni F0) għas-sustanza kimika tat-test matul il-fażi ta' riproduzzjoni. L-esponiment ikompli matul l-iżvilupp u r-riproduzzjoni fl-F1 u t-tifqis fil-ġenerazzjoni F2; b'hekk, l-assaġġ jippermetti l-evalwazzjoni tal-perkorsi endokrinali strutturali kif ukoll attivazzjonali. Jista' jintuża approċċ tal-piż tal-evidenza meta jiġu interpretati l-punti ta' tmiem relatati mas-sistema endokrinali.

4. It-test għandu jinkludi numru adegwat ta' individwi biex tiġi żgurata saħħa suffiċjenti għall-evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem rilevanti għar-riproduzzjoni (ara l-Appendiċi 3) filwaqt li jiġi żgurat li n-numru ta' annimali użati jkun il-minimu meħtieġ għal raġunijiet ta' benessri tal-annimali. Fid-dawl tan-numri kbar ta' annimali tat-test użati, importanti li tiġi kkunsidrata bir-reqqa l-ħtieġa għat-test b'rabta mad-*data* eżistenti li diġà jaf ikun fiha informazzjoni rilevanti fuq ħafna mill-punti ta' tmiem fl-MEOGRT. Xi għajnuna f'dan ir-rigward tista' tinkiseb mill-Qafas tal-OECD għall-Ittestjar tat-Tossiċità tal-Ħut (1).

5. Il-metodu ta' ttestjar tfassal primarjament biex jiddistingwi l-effetti ta' sustanza waħda. Madankollu, jekk ikun hemm bżonn li jsir test fuq taħlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk dan hux se jipprovdi riżultati aċċettabbli għall-fini regolatorju maħsub.

6. Qabel ma jinbeda t-test, importanti li wieħed ikollu informazzjoni dwar il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, b'mod partikolari biex ikunu jistgħu jiġu prodotti soluzzjonijiet kimiċi stabbli. Hu neċessarju wkoll li jkun hemm metodu analitiku sensittiv b'mod adegwat għall-verifika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. It-test jinbeda bl-esponiment ta' rġiel u ta' nisa sesswalment maturi (tal-anqas 12-il wpf) f'pari tat-tgħammir għal tliet ġimgħat, li matulhom is-sustanza kimika tat-test titqassam fl-organiżmu tal-ġenerazzjoni tal-ġenituri (F0) skont l-imġiba tossikokinetika tagħha. L-aktar qrib possibbli tal-ewwel jum tar-raba' ġimgħa, il-bajd jingħabar biex tinbeda l-ġenerazzjoni F1. Matul it-trobbija tal-ġenerazzjoni F1 (15-il ġimgħa b'kollox), jiġu vvalutati l-kapaċità ta' tifqis u s-sopravivenza. Barra minn hekk, jittieħed kampjun tal-ħut wara 9-10 wpf għall-punti ta' tmiem tal-iżvilupp u r-riproduzzjoni tiġi vvalutata għal tliet ġimgħat mit-12 sal-14-il wpf. Ġenerazzjoni F2 tinbeda wara t-tielet ġimgħa tal-valutazzjoni tar-riproduzzjoni u titrabba sat-tlestija tat-tifqis.

KRITERJI TA' VALIDITÀ TAT-TEST

8. Japplikaw il-kriterji li ġejjin għall-validità tat-test:

— Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun ≥ 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja matul it-test;

— It-temperatura medja tal-ilma tul id-durata sħiħa tal-istudju għandha tkun ta' bejn 24 u 26 °C. Ħarġiet qosra mill-medja skont l-akkwarji individwali ma għandhomx ikunu aktar minn 2 °C;

— Il-fekondità medja tal-kontrolli f'kull waħda mill-ġenerazzjonijiet (F0 u F1) għandha tkun akbar minn 20 bajda għal kull par kull jum. Il-fertilità tal-bajd kollu prodott matul il-valutazzjoni għandha tkun akbar minn 80 %. Barra minn hekk, 16 mill-24 par tat-tnissil tal-kontroll rakkomandati (> 65 %) għandhom jipproduċu aktar minn 20 bajda għal kull par kull jum;

— Il-kapaċità ta' tifqis tal-bajd għandha tkun ≥ 80 % (medja) fil-kontrolli (f'kull waħda mill-ġenerazzjonijiet F1 u F2);

— Is-sopravivenza wara t-tifqis sa 3 wpf u minn 3 wpf sat-terminazzjoni għall-ġenerazzjoni F1 (jiġifieri 15-il wpf) għandha tkun ≥ 80 % (medja) u ≥ 90 % (medja), rispettivament fil-kontrolli (F1);

— Għandha tkun disponibbli evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla.

Rigward it-temperatura tal-ilma, filwaqt li din mhix kriterju tal-validità, repliki fi ħdan trattament ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin, u l-gruppi ta' trattament fi ħdan test ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin (fuq il-bażi tal-kejlijiet tat-temperatura ta' kuljum, u esklużi ħarġiet qosra).

9. Għalkemm tista' tiġi osservata riproduzzjoni mnaqqsa fil-gruppi ta' esponiment ogħla, għandu jkun hemm riproduzzjoni suffiċjenti tal-anqas fit-tielet l-ogħla grupp u fil-gruppi inferjuri kollha ta' F0 biex jimtlew l-inkubaturi tat-tifqis. Barra minn hekk, għandu jkun hemm sopravivenza embrijonka adegwata fit-tliet gruppi bl-ogħla u bl-anqas esponiment fl-F1 biex tkun tista' ssir evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem fil-kampjunar subadult (ara l-paragrafi 36 u 38 u l-Appendiċi 9). Barra minn hekk, tal-anqas għandu jkun hemm sopravivenza minima wara t-tifqis (~20 %) fit-tieni l-ogħla grupp ta' esponiment tal-F1. Dawn mhumiex kriterji ta' validità per se, iżda rakkomandazzjonijiet biex ikunu jistgħu jiġu kkalkolati NOECs robusti.

10. Jekk tiġi osservata devjazzjoni mill-kriterji ta' validità tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tar-riżultati tat-test u dawn id-devjazzjonijiet u l-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapport tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

11. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

(a) ossiġenu u apparati li jkejlu l-pH;

(b) tagħmir għad-determinazzjoni tal-ebusija u tal-alkalinità tal-ilma;

(c) apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment monitoraġġ kontinwu;

(d) tankijiet magħmula minn materjal kimiku inerti u b'kapaċità adattata b'rabta mad-densità rrakkomandata tat-tagħbija u tal-istokkjar (ara l-Appendiċi 3);

(e) bilanċ preċiż biżżejjed (jiġifieri preċiż sa ± 0,5 mg).

L-ilma

12. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwat fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Biex jiġi żgurat li l-lima tad-dilwizzjoni ma jkollux influwenza żejda fuq ir-riżultat tat-test (pereżempju b'kumplessazzjoni tas-sustanza kimika tat-test) jew ma jaffettwax b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk riproduttiv, għandhom jittieħdu kampjuni f'intervalli għall-analiżi. Għandu jsir il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), il-pestiċidi, il-karbonju organiku totali u s-solidi sospiżi, pereżempju, kull sitt xhur meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li jkun relattivament kostanti fil-kwalità. Ċerti karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' ± 0,5 unitajiet tal-pH.

Sistema ta' esponiment

13. Id-disinn u l-materjali użati għas-sistema ta' esponiment mhumiex speċifikati. Ħġieġ, azzar inossidabbli, jew materjal kimikament inerti ieħor għandu jintuża għall-bini tas-sistema tat-test li ma tkunx ġiet kontaminata matul it-testijiet preċedenti. Għall-fini ta' dan it-test, sistema ta' esponiment xierqa tista' tkun tikkonsisti f'sistema bi fluss kontinwu (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Is-soluzzjonijiet tat-test

14. Is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandha titwassal fis-sistema ta' esponiment b'pompa xierqa. Ir-rata ta' fluss tas-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi kalibrata skont konferma analitika tas-soluzzjonijiet tat-test qabel it-tnedija tal-esponiment, u tiġi verifikata volumetrikament kull ċertu żmien matul it-test. Is-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment tiġġedded b'mod adegwat (eż. il-volum jiġġedded għal ħames darbiet kuljum sa 16-il tiġdid kuljum jew fluss sa 20 ml/min) skont l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test u l-kwalità tal-ilma.

15. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jitħejjew billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija preferibbilment għandha titħejja billi sempliċiment titħallat jew titħawwad is-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni b'mezzi mekkaniċi (eż. bit-tħawwid jew bl-ultrasonikazzjoni). Jistgħu jintużaw kolonni/sistemi ta' saturazzjoni jew metodi ta' dożaġġ passiv (14) biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Għandu jittieħed kull sforz biex jiġu evitati solventi jew trasportaturi għaliex: (1) ċerti solventi nfushom jistgħu jirriżultaw f'tossiċità u/jew f'risponsi mhux mixtieqa jew mhux mistennija, (2) l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi f'livell ogħla mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom (hekk kif spiss jista' jseħħ bl-użu tas-solventi) jista' jirriżulta f'determinazzjonijiet impreċiżi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, (3) l-użu ta' solventi f'testijiet aktar fit-tul jista' jirriżulta fi grad sinifikanti ta' "biofilming" assoċjata ma' attività mikrobika li tista' tħalli impatt fuq il-kundizzjonijiet ambjentali kif ukoll fuq il-ħila li jinżammu l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment u (4) fl-assenza ta' *data* storika li turi li s-solvent ma jinfluwenzax l-eżitu tal-istudju, l-użu ta' solventi jeħtieġ trattament ta' kontroll b'solvent li għandu implikazzjonijiet fuq il-benessri tal-annimali peress li jkunu meħtieġa annimali addizzjonali biex isir it-test. Għal sustanzi kimiċi li diffiċli tittestjahom, solvent jista' jintuża bħala l-aħħar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida 23 tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akkwatika ta' Sustanzi u ta' Taħlitiet Diffiċli (15) biex jiġi determinat l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent se tiġi determinata mill-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test u mid-disponibbiltà ta' *data* storika dwar l-użu tas-solvent. Jekk jintużaw trasportaturi tas-solvent, għandhom jiġu evalwati kontrolli b'solvent xierqa minbarra kontrolli (negattivi) mhux b'solvent (ilma ta' dilwizzjoni biss). F'każ li l-użu ta' solvent ma jkunx evitabbli, u sseħħ attività mikrobika (biofilming), hu rakkomandat li jinżamm rekord/li jiġi rapportat dwar il-biofilming għal kull tank (tal-anqas kull ġimgħa) matul it-test sħiħ. Idealment, il-konċentrazzjoni tas-solvent għandha tinżamm kostanti fil-kontroll b'solvent u fit-trattamenti kollha tat-test. Jekk il-konċentrazzjoni tas-solvent ma tinżammx kostanti, għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni tas-solvent fit-trattament tat-test fil-kontroll b'solvent. F'każijiet li fihom jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet massimi tas-solvent ma għandhomx jaqbżu l-100 µl/l jew 100 mg/l (15), u hu rakkomandat li l-konċentrazzjoni b'solvent tinżamm għall-anqas livell possibbli (*eż.* < 20 µl/l) biex jiġi evitat effett potenzjali tas-solvent fuq il-punti ta' tmiem imkejla (16).

L-annimali tat-test

Għażla u żamma tal-ħut

16. L-ispeċi tat-test hi l-medaka *Oryzias latipes* minħabba ċ-ċiklu tal-ħajja qasir tagħha u l-possibbiltà li jiġi determinat is-sess ġenetiku. Għalkemm speċijiet oħra ta' ħut żgħir jistgħu jkunu adattati għal protokoll tat-test simili, il-metodi speċifiċi u l-punti ta' tmiem osservazzjonali spjegati f'dan il-metodi ta' ttestjar huma applikabbli għall-medaka biss (ara l-paragrafu 1). Il-medaka tiġi indotta minnufih biex titnissel f'kaptività; jeżistu metodi ppubblikati għall-koltura tagħha (17) (18) (19), u hemm *data* disponibbli minn testijiet tal-letalità fuq terminu qasir tal-istadju bikri tal-ħajja u taċ-ċiklu sħiħ tal-ħajja (5) (6) (8) (9) (20). Il-ħut kollu jinżamm fuq fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl:8 sigħat dlam. Il-ħut jintema' gambli ħaj tal-ilma mielaħ, *Artemia* spp., li jistgħu jiġu supplimentati b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn. L-ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli għandu jiġi analizzat b'mod regolari għall-kontaminanti.

17. Dment li jiġu segwiti prattiki xierqa tat-trobbija, ma jkun meħtieġ ebda protokoll speċifiku tal-koltura. Pereżempju, il-medaka tista' titrabba f'tankijiet taż-2 l b'240 ħuta larva f'kull tank sar-4 wpf, u mbagħad jistgħu jitrabbew f'tankijiet taż-2 l b'10 ħutiet f'kull tank sat-8 wpf, meta dawn jiġu trasferiti f'tankijiet taż-2 l f'pari tat-tgħammir.

Akklimazzjoni u għażla tal-ħut

18. Il-ħut tat-test għandu jintgħażel minn stokk wieħed tal-laboratorju li jkun tħalla jderri għal tal-anqas ġimagħtejn qabel it-test fil-kondizzjonijiet ta' kwalità tal-ilma u ta' illuminazzjoni li jkunu simili għal dawk użati fit-test (Nota: Dan il-perjodu ta' akklimazzjoni mhuwiex perjodu ta' qabel l-esponiment *in situ*). Hu rakkomandat li l-ħut tat-test jinkiseb minn koltura interna, peress li t-trasport ta' ħut adult hu stressanti u jista' jtellef ir-riproduzzjoni affidabbli. Il-ħut għandu jintema' nauplii tal-gambli tal-ilma mielaħ darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' żamma kollu u matul il-fażi ta' esponiment kollha, supplimentat b'ikel fil-forma ta' laqx disponibbli kummerċjalment jekk ikun hemm bżonn. Tal-anqas 42 par tat-tgħammir (54 par tat-tgħammir jekk ikun meħtieġ kontroll b'solvent minħabba, parzjalment, nuqqas ta' *data* storika li ssostni l-użu tal-kontroll mhux b'solvent biss) huma meqjusa neċessarja biex jinbeda dan it-test bl-għan li tiġi żgurata replika adegwata. Barra minn hekk, kull par tat-tgħammir ta' F0 għandu jiġi verifikat li jkun XX-XY (jiġifieri komplement normali ta' kromożomi as-sess f'kull sess) biex tiġi evitata l-inklużjoni possibbli ta' rġiel XX spontanji (ara l-paragrafu 39).

19. Minħabba l-fażi ta' akklimazzjoni, il-mortalitajiet fil-ħut tal-koltura għandhom jiġu reġistrati u għandhom jiġu applikati l-kriterji li ġejjin wara perjodu ta' ssetiljar ta' 48 siegħa:

— Mortalijiet akbar minn 10 % tal-popolazzjoni tal-koltura f'sebat ijiem qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: irrifjuta l-lott sħiħ;

— Mortalijiet ta' bejn 5 % u 10 % tal-popolazzjoni fis-sebat ijiem ta' qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: akklimazzjoni għal sebat ijiem addizzjonali għall-perjodu ta' akklimazzjoni ta' ġimagħtejn (2); jekk ikun hemm mortalità akbar minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, irrifjuta l-lott kollu;

— Mortalijiet ta' anqas minn 5 % tal-popolazzjoni fis-sebat ijiem ta' qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: aċċetta l-lott.

20. Il-ħut ma għandux jirċievi trattament għal mard fil-perjodu ta' akklimazzjoni ta' ġimagħtejn qabel it-test u matul il-perjodu ta' esponiment, u t-trattament tal-mard għandu jiġi evitat għalkollox jekk dan ikun possibbli. Ħut b'sinjali kliniċi ta' mard ma għandux jintuża fl-istudju. Għandu jinżamm rekord ta' osservazzjonijiet u ta' kwalunkwe trattament profilattiku u terapewtiku tal-mard matul il-perjodu tal-koltura ta' qabel it-test.

21. Il-fażi ta' esponiment għandha tinbeda b'ħut adult sesswalment dimorfiku u mqassam skont is-sess ġenetiku minn provvista mil-laboratorju ta' annimali maturi riproduttivament kolturati f'25 ± 2 °C. Il-ħut għandu jiġi identifikat bħala nisiel ipprovat (jiġifieri jkun ipproduċa wlied vijabbli) matul il-ġimgħa ta' qabel l-esponiment. Għall-grupp kollu ta' ħut użat fit-test, il-medda tal-piżijiet individwali skont is-sess fil-bidu tat-test għandha tinżamm fi ħdan ± 20 % tal-piż medju aritmetiku tal-istess sess. Subkampjun tal-ħut għandu jintiżen qabel it-test biex jiġi stmat il-piż medju. Il-ħut magħżul għandu jkollu tal-anqas 12-il wpf, ikun jiżen ≥ 300 mg għan-nisa u ≥ 250 mg għall-irġiel.

DISINN TAT-TEST

Konċentrazzjonijiet tat-test

22. Hu rakkomandat li jintużaw ħames konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi flimkien mal-kontroll(i). Is-sorsi kollha ta' informazzjoni għandhom jiġu kkunsidrati meta tingħażel il-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, inklużi r-relazzjonijiet kwantitattivi bejn l-istruttura u l-attività (QSARs), ir-read-across minn analogi, ir-riżultati tat-testijiet fuq il-ħut bħal assaġġi tat-tossiċità akuta (il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness), l-assaġġ dwar ir-riproduzzjoni fuq terminu qasir tal-ħut (il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness) u metodi ta' ttestjar oħra, eż. il-Kapitoli C.15, C.37, C.41, C.47 jew C.49 ta' dan l-Anness (21) (22) (23) (24) (25) (26) jekk disponibbli, jew jekk ikun hemm bżonn, minn test ta' sejbien tal-medda, possibilment inkluża fażi ta' riproduzzjoni. Jekk ikun hemm bżonn, it-test ta' sejbien tal-medda jista' jsir f'kundizzjonijiet (kwalità tal-ilma, sistema tat-test, tgħabbija tal-annimali) simili għal dawk użati għat-test definittiv. Jekk l-użu ta' solvent ikun neċessarju u ma jkun hemm ebda *data* storika disponibbli, it-test ta' sejbien tal-medda jista' jintuża biex jidentifika x-xerqien tas-solvent. L-ogħla konċentrazzjoni tat-test ma għandhiex taqbeż is-solubbiltà fl-ilma, 10 mg/l jew 10 % tas-96h-LC50 (27). L-anqas konċentrazzjoni għandha tkun fattur ta' 10 sa 100 darba anqas mill-ogħla konċentrazzjoni. L-użu ta' ħames konċentrazzjonijiet f'dan it-test jippermetti mhux biss li jitkejlu r-relazzjonijiet bejn id-doża u r-rispons, iżda jipprovdi wkoll il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) u l-NOEC li huma neċessarji għall-valutazzjoni tar-riskju f'ċerti programmi regolatorji jew ġurisdizzjonijiet. Ġeneralment, il-fattur ta' spazjar bejn il-konċentrazzjonijiet nominali tas-sustanza kimika tat-test bejn il-livelli ta' trattament adjaċenti jkun ≤ 3,2.

Repliki fi ħdan gruppi ta' trattament u kontrolli

23. Tal-anqas għandhom jintużaw sitt kompartimenti tat-test repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test (ara l-Appendiċi 7). Matul il-fażi riproduttiva (ħlief il-ġenerazzjoni F0), l-istruttura tar-replika tirdoppja għall-valutazzjoni tal-fekondità u kull replika jkollha par tat-tnissil wieħed biss (ara l-paragrafu 42).

24. Minbarra l-konċentrazzjonijiet tat-test, għandhom isiru kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni u, jekk meħtieġ, kontroll b'solvent. Għandu jintuża numru rdoppjat ta' kompartimenti repliki għall-kontrolli biex tiġi żgurata saħħa statistika adegwata (jiġifieri tal-anqas għandhom jintużaw tnax-il replika għall-kontrolli). Matul il-fażi riproduttiva, in-numru ta' repliki fil-kontrolli jirdoppja (jiġifieri 24 replika bħala minimu u kull replika jkollha par tat-tgħammir wieħed biss). Wara r-riproduzzjoni, ir-repliki tal-kontroll ma għanudx ikun fihom aktar minn 20 embrijun (ħut).

PROĊEDURA

Tnedija tat-test

25. Il-ħut adult riproduttivament attiv użat biex tinbeda l-ġenerazzjoni F0 tat-test jintgħażel fuq il-bażi ta' żewġ kriterji: l-età (tipikament aktar minn 12-il wpf iżda hu rakkomandat li ma jinqabżux is-16-il wpf) u l-piż (għandu jkun ≥ 300 mg għan-nisa u ≥ 250 mg għall-irġiel).

26. Il-pari mara-raġel li jissodisfaw l-ispeċifikazzjonijiet imsemmija hawn fuq jitmexxew bħala pari individwali f'kull replika tat-tank, jiġifieri tnax-il replika f'kontrolli u sitt repliki fi trattamenti kimiċi fil-bidu tat-test. Dawn it-tankijiet jiġu assenjati trattament b'mod aleatorju (eż. T1-T5 u kontroll) u replika (eż. A-L fil-kontrolli u A-F fit-trattament), u mbagħad jitqiegħdu fis-sistema ta' esponiment bil-fluss xieraq f'kull tank.

Il-kundizzjonijiet tal-esponiment

27. Sommarju sħiħ tal-parametri tat-test u tal-kundizzjonijiet jista' jinstab fl-Appendiċi 3. L-aderenza ma' dawn l-ispeċifikazzjonijiet għandha tirriżulta f'ħut tal-kontroll b'valuri tal-punt ta' tmiem simili għal dawk elenkati fl-Appendiċi 4.

28. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, il-pH u t-temperatura għandhom jitkejlu f'tal-anqas reċipjent wieħed tat-test ta' kull grupp tat-trattament u tal-kontroll. Tal-anqas, dawn il-kejlijiet, ħlief it-temperatura, għandhom isiru darba fil-ġimgħa matul il-perjodu ta' esponiment kollu. It-temperatura medja tal-ilma matul id-durata sħiħa tal-istudju għandha tkun bejn 24 u 26 °C matul it-test sħiħ. It-temperatura għandha titkejjel kuljum matul il-perjodu ta' esponiment. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' ± 0,5 unitajiet tal-pH. Repliki fi ħdan trattament ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin, u l-gruppi ta' trattament fi ħdan test ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin (fuq il-bażi tal-kejlijiet tat-temperatura ta' kuljum, u esklużi ħarġiet qosra).

Durata tal-esponiment

29. It-test jesponi ħut sesswalment riproduttiv mill-F0 għal tliet ġimgħat. Fil-ġimgħa 4, bejn wieħed u ieħor fil-jum 24 tat-test, l-F1 tiġi stabbilita u l-pari tat-tgħammir F0 jinqatlu bl-ewtanażja u jittieħed rekord tal-piż u tat-tul (ara l-Paragrafu 34). Dan hu segwit minn esponiment tal-ġenerazzjoni F1 għal aktar minn 14-il ġimgħa oħra (total ta' 15-il ġimgħa għall-F1) u tal-ġenerazzjoni F2 għal ġimagħtejn sat-tifqis. Id-durata totali tat-test hi primarjament ta' 19-il ġimgħa (jiġifieri sat-tifqis tal-F2). L-iskedi ta' żmien għat-test huma murija fit-Tabella 2 u spjegati aktar f'dettall fl-Appendiċi 9.

Reġim tal-għalf

30. Il-ħut jista' jitgħalef il-gambli tal-ilma mielaħ *Artemia* spp. (nauplii li jkollhom 24 siegħa) *ad libitum*, supplimentati b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn. L-ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli għandu jiġi analizzat b'mod regolari għal kontaminanti bħal pestiċidi organokloriniċi, idrokarburi aromatiċi poliċikliċi (PAHs), poliklorobifenili (PCBs). Ikel b'livell elevat ta' sustanzi attivi endokrinalment (jiġifieri fitoestroġeni) li jistgħu jxekklu r-rispons tat-test għandhom jiġu evitati. Ikel mhux mikul u materjal tar-rawt għandhom jitneħħew mir-reċipjenti tat-test skont il-bżonn, eż. billi jitnaddaf il-qiegħ ta' kull tank permezz ta' sifun. Il-ġnub u l-qiegħ ta' kull tank għandhom jitnaddfu wkoll darba jew darbtejn fil-ġimgħa (eż. bil-brix bi spatula). Fl-Appendiċi 5 jingħata eżempju tal-iskeda tat-tagħlif. Ir-rata tat-tagħlif hi bbażata fuq in-numru ta' ħut għal kull replika. Għaldaqstant, ir-rata tat-tagħlif tonqos jekk ikun hemm il-mortalitajiet f'replika.

Determinazzjoni u kejlijiet analitiċi

31. Qabel jibda l-perjodu ta' esponiment, għandu jiġi żgurat li s-sistema tat-twassil tas-sustanza kimika taħdem kif suppost. Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi meħtieġa kollha, inkluż għarfien suffiċjenti dwar l-istabbiltà tas-sustanza kimika fis-sistema tat-test. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli xierqa, idealment tal-anqas kull ġimgħa f'replika waħda għal kull grupp tat-trattament, b'rotazzjoni bejn ir-repliki tal-istess grupp tat-trattament kull ġimgħa.

32. Matul it-test, ir-rati tal-fluss tad-dilwent u tas-soluzzjoni ewlenija għandhom jiġu verifikati f'intervalli kif xieraq (eż. tal-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa). Hu rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla. F'każ ta' sustanzi kimiċi li jakkumulaw b'mod sinifikanti fil-ħut, il-konċentrazzjonijiet tat-test jistgħu jonqsu hekk kif jikber il-ħut. F'każijiet bħal dawn, hu rakkomandat li r-rata ta' tiġdid tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment tiġi adattata biex il-konċentrazzjonijiet tat-test jinżammu l-aktar kostanti possibbli.

Osservazzjonijiet u punti ta' tmiem imkejla

33. Il-punti ta' tmiem imkejla jinkludu l-fekondità, il-fertilità, it-tifqis, it-tkabbir u s-sopravivenza għall-evalwazzjoni tal-effetti possibbli fil-livell tal-popolazzjoni. L-osservazzjonijiet tal-imġiba għandhom isiru ta' kuljum ukoll, u kwalunkwe mġiba mhux tas-soltu għandha tiġi notata. Punti ta' tmiem mekkanistiċi oħra jinkludu l-livelli tal-proteini epatiċi tal-mRNA *vtg* jew tal-VTG b'immunoassaġġ (28), markaturi fenotipiċi sesswali bħall-papilli karatterisiċi tal-papilli tal-pinen anali tal-irġel, evalwazzjoni istoloġika tas-sess gonadali, u evalwazzjoni istopatoloġika tal-kilwa, tal-fwied u tal-gonad (ara l-lista ta' punti ta' tmiem fit-Tabella 1). Dawn il-punti ta' tmiem speċifiċi kollha jiġu evalwati fil-kuntest ta' determinazzjoni tas-sess ġenetiku tal-individwu, fuq il-bażi tal-preżenza jew tal-assenza tad-*dmy* tal-ġene li jiddetermina s-sess masiki tal-medaka (ara l-paragrafu 41). Barra minn hekk jiġi evalwat il-ħin għar-riproduzzjoni wkoll. Barra minn hekk, il-proporzjonijiet sempliċi tas-sessi fenotipiċi jistgħu jinkisbu bl-użu tal-informazzjoni mill-għadd ta' papilli tal-pinen anali biex medaka individwali jiġu definiti bħala fenotipikament irġiel jew nisa. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jkunx mistenni jindividwa devjazzjonijiet modesti mill-proporzjon mistenni tas-sessi peress li n-numri relattivament żgħar ta' ħut għal kull replika mhux se jipprovdi biżżejjed saħħa statistika. Barra minn hekk, matul il-valutazzjoni istopatoloġika, il-gonad jiġi evalwat u jsiru analiżijiet ferm aktar b'saħħithom għall-valutazzjoni tal-fenotip tal-gonad fil-kuntest tas-sess ġenetiku.

34. L-iskop primarju ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jivvaluta l-effetti potenzjali rilevanti għall-popolazzjoni ta' sustanza kimika tat-test. Il-punti ta' tmiem mekkanistiċi (VTG, SSCs u ċerti effetti tal-istopatoloġija gonadali) jistgħu jassistu wkoll fid-determinazzjoni ta' jekk xi effett huwiex medjat b'xi attività endokrinali. Madankollu, dawn il-punti ta' tmiem mekkanistiċi jistgħu jkunu influwenzati wkoll minn tossiċitajiet sistemiċi u oħrajn. Konsegwentement, l-istopatoloġija tal-fwied u tal-kliewi tista' tiġi vvalutata wkoll f'dettall biex jinftiehem aħjar kwalunkwe rispons f'punti ta' tmiem mekkanistiċi. Madankollu, jekk ma jsirux dawn l-evalwazzjonijiet dettaljati, anormalitajiet grossi osservati b'mod inċidentali matul l-evalwazzjoni istopatoloġika xorta waħda għandhom jiġu nnotati u rapportati.

Il-qtil bl-ewtanażja tal-ħut

35. Fit-terminazzjoni tal-esponiment tal-ġenerazzjoni F0 u F1, u meta jittieħed kampjun tal-ħut subadult, il-ħut għandu jiġi ewtanizzat b'ammonti xierqa ta' soluzzjoni anestetika (eż. Trikaina metan sulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l) baferjata bi 300 mg/l $NaHCO_3$ (bikarbonat tas-sodju, CAS.144-55-8) biex titnaqqas l-irritazzjoni tal-membrana mukuża. Jekk il-ħut ikun qed juri sinjali tac tbatija konsiderevoli (serji ħafna u l-mewt tista' titbassar b'mod affidabbli) u jitqies moribund, l-annimali għandhom jiġu anestetizzati u ewtanizzati u trattati bħala mortalità għall-analiżi tad-*data*. Meta ħuta tiġi ewtanizzata minħabba morbidità, dan għandu jiġi notat u rapportat. Skont meta l-ħuta tiġi ewtanizzata matul l-istudju, il-ħuta tista' tinżamm għall-analiżi tal-istopatoloġija (iffissar tal-ħuta għall-istopatoloġija possibbli).

Immaniġġjar tal-bajd u tal-ħut larvali

Il-ġbir tal-bajd minn pari tat-tnissil biex tiġi propagata l-ġenerazzjoni li jmiss

36. Il-ġbir tal-bajd isir fl-ewwel jum (jew fl-ewwel jumejn, jekk ikun hemm bżonn) tal-Ġimgħa 4 tat-Test għall-proċediment mill-F0 għall-F1 u tal-Ġimgħa 18 tat-Test għall-proċediment mill-F1 għall-F2. Il-Ġimgħa 18 tat-Test tikkorrispondi għal ħut adult tal-F1 li jkollu 15-il wpf (ġimgħat wara l-fertilizzazzjoni). Importanti li l-bajd kollu jitneħħa minn kull tank jum qabel ma jibda l-ġbir tal-bajd biex jiġi żgurat li l-bajd kollu miġbur minn par tat-tnissil ikun ġej minn riproduzzjoni waħda. Wara r-riproduzzjoni, il-medaka mara kultant iġġorr il-bajd tagħha qrib il-fetħa sakemm il-bajd ikun jista' jiġi depożitat fuq substrat. B'ebda substrat preżenti fit-tank, il-bajd jista' jinstab jew imqabbad mal-mara jew fil-qiegħ tat-tank. Skont il-post tiegħu, il-bajd jitneħħa bir-reqqa mill-mara jew jinġibed b'sifun mill-qiegħ fil-Ġimgħa 4 tat-Test tal-F0 u fil-Ġimgħa 18 tat-Test tal-F1. Il-bajd kollu miġbur fi ħdan trattament jinġabar flimkien qabel id-distribuzzjoni f'kompartimenti ta' inkubazzjoni.

37. Il-filamenti tal-bajd, li jżommu l-bajd riprodott flimkien, għandhom jitneħħew. Il-bajd fertilizzat (sa 20) jinġabar minn kull par tat-tnissil (par 1 għal kull replika), jinġabar skont it-trattament, u jitqassam b'mod sistematiku f'kompartimenti xierqa ta' inkubazzjoni (Appendiċi 6, 7). Bl-użu ta' mikroskopju ta' kwalità tajba, wieħed ikun jsita' jara l-indikaturi ta' fertilizzazzjoni/żvilupp bikrin bħat-tlugħ tal-membrana tal-fertilizzazzjoni (korjon), id-diviżjoni kurrenti taċ-ċelloli, jew il-formazzjoni tal-blastula. Il-kompartimenti tal-inkubaturi jistgħu jitqiegħdu f'"akkwarji inkubaturi" separati stabbiliti għal kull trattament (f'liema każ il-parametri tal-kwalità tal-ilma u l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test iridu jitkejlu fihom), jew fl-akkwarju replika li fih ikun hemm il-larva mfaqqsa (*eż.* elewteroembrijun). Jekk ikun hemm bżonn tat-tieni jum tal-ġbir (Jum 23 tat-Test), il-bajd kollu minn dawn iż-żewġ ġranet għandu jinġabar flimkien u mbagħad jitqassam b'mod sistematiku f'kull waħda mir-repliki tat-trattament.

Trobbija tal-bajd għat-tifqis

38. Il-bajd fertilizzat jitheżżeż il-ħin kollu *eż.*, fi ħdan l-inkubatur tal-bajd bi bżieżaq tal-arja jew bit-tbandil vertikali tal-inkubatur tal-bajd. Il-mortalitajiet tal-bajd fertilizzat (embrijuni) jiġu verifikati u reġistrati ta' kuljum. Bajd mejjet jitneħħa mill-inkubaturi (Appendiċi 9). Fil-jum 7 wara l-fertilizzazzjoni (dpf), it-theżżiż jitwaqqaf jew jitnaqqas biex il-bajd fertilizzat ikun jista' joqgħod fil-qiegħ tal-inkubatur. Dan jippromwovi t-tifqis, tipikament tul il-jum jew il-jumejn segwenti. Għal kull trattament u kontroll, l-imfaqqsa (larva żgħar; elewteroembrijun) jingħaddu (fuq il-bażi ta' repliki miġbura flimkien). Il-bajd fertilizzat li ma jkunx għadu faqqas sad-doppju tal-jum medjan tat-tifqis fil-kontroll (tipikament dpf 16 jew 18) jitqies mhux vijabbli u jintrema.

39. Tnax-il imfaqqas jiġu trasferiti f'kull tank replika. L-imfaqqsa mill-kompartimenti ta' inkubazzjoni jinġabru flimkien u jitqassmu b'mod sistematiku f'tankijiet replika (Appendiċi 7). Dan jista' jsir bl-għażla aleatorja ta' mfaqqas mill-grupp tat-trattament u biż-żieda sekwenzjali ta' mfaqqas fi grupp indiskriminat f'akwarju replika. Kull wieħed mit-tankijiet għandu jkun fih numru ugwali (n=12) tal-larva mfaqqsa (massimu ta' 20 larva kull wieħed). Jekk ma jkunx hemm biżżejjed imfaqqsa biex jimtlew ir-repliki kollha tat-trattament, hu rakkomandat li jiġi żgurat l-akbar ammont possibbli ta' repliki bi 12-il imfaqqas. L-imfaqqsa jistgħu jiġu mmaniġġjati b'mod sikur b'pipetti tal-ħġieġ b'toqba wiesgħa. Kwalunkwe mfaqqas addizzjonali jinqatel bl-ewtanażja bl-anestetiku. Matul il-ftit ġimgħat ta' qabel l-istabbiliment tal-pari tat-tnissil, għandu jiġi rreġistrat il-jum li fih jiġi osservat l-ewwel avveniment ta' riproduzzjoni f'kull replika.

Stabbiliment tal-pari tat-tnissil

Qtugħ tal-pinen u determinazzjoni tas-sess ġenotipiku

40. Id-determinazzjoni tas-sess ġenotipiku permezz tal-qatgħat tal-pinen issir fid-9-10 wpf (jiġifieri l-Ġimgħa 12-13 tat-Test għall-ġenerazzjoni F1). Il-ħut kollu fi ħdan tank jiġi anestetizzat (bl-użu ta' metodi approvati, eż. IACUC) u jittieħed kampjun tat-tessut żgħir mit-tarf dorsali jew ventrali tal-pinna tad-denb ta' kull ħuta biex jiġi determinat is-sess ġenotipiku tal-individwu (29). Il-ħuta minn replika tista' titqiegħed f'gaġeġ żgħar, jekk possibbli waħda f'kull gaġġa, fit-tank replika. Inkella, żewġ ħutiet jistgħu jinżammu f'kull gaġġa jekk ikunu distingwibbli minn xulxin. Metodu minnhom hu li tinqata' b'mod differenzjali l-pinna tad-denb (*eż.* tarf dorsali vs ventrali) meta jittieħed il-kampjun tat-tessut.

41. Is-sess ġenotipiku tal-medaka jiġi determinat b'ġene identifikat u sekwenzjat (*dmy*) li jinsab fuq il-kromożoma Y. Il-preżenza tad-*dmy* tindika individwu XY indipendentement mill-fenotip, filwaqt li n-nuqqas ta' *dmy* jindika individwu XX indipendentement mill-fenotip (30); (31). Jiġi estratt l-aċidu nuklejku deossiriboż (DNA) minn kull qatgħa ta' pinna u l-preżenza jew l-assenza ta' *dmy* tkun tista' tiġi determinata b'metodi ta' reazzjoni tal-katina tal-polimeraži (PCR) (irreferi għall-Appendiċi 9 fil-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, jew għall-Appendiċijiet 3 u 4 f'(29).

Stabbiliment tal-pari tat-tnissil

42. L-informazzjoni dwar is-sess ġenotipiku tintuża biex jiġu stabbiliti l-pari tat-tnissil XX-XY indipendentement mill-fenotip estern li jista' jiġi alterat bl-esponiment għal sustanza kimika tat-test. Fil-jum ta' wara dak li fih jiġi determinat is-sess ġenotipiku ta' kull ħuta, jintgħażlu b'mod aleatorju żewġ ħutiet XX u żewġ ħutiet XY minn kull replika u jiġu stabbiliti żewġ pari tat-tnissil XX-XY. Jekk replika ma jkollhiex żewġ ħutiet XX jew żewġ ħutiet XY, għandu jinkiseb il-ħut xieraq minn repliki oħra fi ħdan it-trattament. Il-prijorità hi li jkun hemm in-numru rakkomandat ta' pari tat-tnissil repliki (12) f'kull trattament u fil-kontrolli (24). Ħut b'anormalitajiet ovvji (problemi fil-bużżieqa tal-għawm, deformitajiet fis-sinsla, varjazzjonijiet estremi fid-daqs, eċċ.) ikun prekluż meta jiġu stabbiliti l-pari tat-tnissil. Matul il-faži riproduttiva għall-F1, kull tank replika għandu jkun fih par tat-tnissil wieħed biss.

Kampjunar ta' subadulti u valutazzjoni tal-punti ta' tmiem

Kampjunar ta' ħut f'pari mhux tat-tgħammir

43. Wara l-issettjar tal-pari tat-tnissil, il-ħut mhux magħżul għal tgħammir ulterjuri jinqatel bl-ewtanażja għall-kejl tal-punti ta' tmiem subadulti fil-Ġimgħa 12-13 tat-Test (F1). Hu estremament importanti li l-ħut jiġi mmaniġġjat b'tali mod li s-sess ġenotipiku determinat għall-għażla tal-pari tat-tgħammir ikun għadu jista' jiġi traċċat għalħuta

individwali. Id-*data* kollha miġbura tiġi analizzata fil-kuntest tas-sess ġenotipiku tal-ħut speċifiku. Kull ħuta tintuża għal varjetà ta' kejlijiet tal-punti ta' tmiem inklużi: determinazzjoni tar-rati ta' sopravivenza ta' ħut li għadu qed jikber/subadult (Ġimgħat 7-12/13 tat-Test (F1), tkabbir fit-tul (tul standard jista' jitkejjel jekk il-pinna tad-denb tkun tqassret minħabba l-kampjunar għall-analiżi tas-sess ġenetiku. It-tul totali jista' jitkejjel jekk jittieħed kampjun ta' parti biss mill-pina tad-denb, dorsali jew ventrali, għad-*dmy*) u l-massa tal-ġisem (jiġifieri l-piż imxarrab, ixxottat bit-taptip) l-mRNA tal-*vtg* tal-fwied (jew il-VRG) u l-papilli tal-pinna anali (ara t-Tabelli 1 u 2). Kun af li l-piżijiet u t-tul tal-pari tat-tnissil huma meħtieġa wkoll għall-kalkolu tat-tkabbir medju fi grupp tat-trattament.

Kampjunar tat-tessuti u kejl tal-vitelloġenina

44. Il-fwied jinqata', u għandu jinħażen f'≤ –70 °C sal-kejl tal-mRNA tal-*vtg* (jew il-VTG). Id-denb tal-ħut, inkluża l-pinna anali, jiġi preservat f'fissattiv xieraq (eż. ta' Davidson) jew jittiħidlu ritratt biex il-papilli tal-pinna anali jkunu jistgħu jingħaddu f'data aktar tard. Jekk dan ikun mixtieq, jista' jittieħed kampjun ta' tessuti oħra (jiġifieri gonad) u dawn jistgħu jiġu preservati f'dan il-ħin). Il-konċentrazzjoni tal-VTG tal-fwied għandha tiġi kwantifikata b'teknika ELISA omologa (ara l-proċeduri rakkomandati għall-medaka fl-Appendiċi 6 fil-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness). Inkella, il-metodi għall-kwantifikazzjoni tal-mRNA tal-vtg, jiġifieri l-estrazzjoni tal-mRNA tal-ġene *vtg I* minn kampjun tal-fwied u kwantifikazzjoni tan-numru ta' kopji tal-ġene *vtg I* (għal kull ng tal-mRNA totali) bil-PCR kwantitattiva, ġew stabbilti mill-EPA tal-Istati Uniti (29). Minflok ma jiġi determinat in-numru ta' kopji tal-ġene *vtg* fil-gruppi tal-kontroll u tat-trattament, metodu aktar effiċjenti fir-riżorsi u anqas teknikament diffiċli hu li jiġi determinat it-tibdil (ta' drabi) relattiv fl-espressjoni tal-vtg I mill-gruppi tal-kontroll u tat-trattament.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

45. F'ċirkustanzi normali, medaka rġiel sesswalment maturi biss ikollhom papilli, li jiżviluppaw fuq il-pjastri konġunti ta' ċerti raj tal-pinna anali bħala karatteristika sesswali sekondarja, filwaqt li jipprovdu bijomarkatur potenzjali għal effetti ta' intereferenza endokrinali. Il-metodu tal-għadd tal-papilli tal-pinen anali (in-numru ta' pjastri konġunti bil-papilli) jingħata fl-Appendiċi 8. Barra minn hekk, in-numru ta' papilli tal-pinen anali għal kull individwu jintuża biex dak l-individwu jiġi karatterizzat bħala raġel jew mara esternament fenotipiċi għall-fini tal-kalkolu ta' proporzjon sempliċi tas-sessi għal kull replika. Medaka bi kwalunkwe numru akbar minn 0 tiġi definita bħala raġel; medaka b'ebda papilla tal-pinna anali tiġi definita bħala mara.

Valutazzjoni tal-fekondità u tal-fertilità

46. Il-fekondità u l-fertilità jiġu vvalutati fil-Ġimgħat 1 sa 3 tat-Test fil-ġenerazzjoni F0 u l-Ġimgħat 15 sa 17 tat-Test fil-ġenerazzjoni F1. Il-bajd jinġabar ta' kuljum minn kull par tat-tgħammir għal 21 jum konsekuttiv. Il-bajd jitneħħa bil-galbu min-nisa maqbuda u/jew jinġibdu b'sifun mill-qiegħ tal-akkwarju kull għodwa. Kemm il-fekondità kif ukoll il-fertilità jiġu reġistrati ta' kuljum għal kull par replika tat-tgħammir. Il-fekondità hi definita bħala n-numru ta' bajd riprodotti, u l-fertilità hi funzjonalment definita bħala n-numru ta' bajd fertilizzat u vijabbli fil-ħin tal-għadd. L-għadd għadu jsir mill-aktar fis possibbli wara l-ġbir tal-bajd.

47. Il-fekondità tar-repliki tiġi reġistrata ta' kuljum bħala n-numru ta' bajd għal kull par tat-tgħammir li jiġi analizzat bil-proċeduri statistiċi rakkomandati bl-użu tal-medji tar-repliki. Il-fertilità tar-repliki hi s-somma tan-numru ta' bajd fertili prodott minn par tat-tgħammir diviża bis-somma tan-numru ta' bajd prodott minn dak il-par. Statistikament il-fertilità tiġi analizzata bħala proporzjon għal kull replika. Il-kapaċità ta' tifqis tar-repliki hi n-numru ta' mfaqqsa diviż bin-numru ta' embrijuni mgħobbija (tipikament 20). Statistikament il-kapaċità ta' tifqis tiġi analizzata bħala proporzjon għal kull replika.

Kampjunar ta' adulti u valutazzjoni tal-punti ta' tmiem

Kampjunar ta' ħut f'pari tat-tgħammir

48. Wara l-Ġimgħa 17 tat-Test (jiġifieri wara li tibda b'suċċess il-ġenerazzjoni F2), l-adulti F1 jinqatlu bl-ewtanażja u jiġu vvalutati diversi punti ta' tmiem (ara t-Tabelli 1 u 2). Tittieħed immaġni tal-pinna anali għall-valutazzjoni tal-papilli tal-pinen anali (ara l-Appendiċi 8), u/jew id-denb, eżatt wara t-toqba, jitneħħa u jiġi ffissat għall-għadd tal-papilli aktar tard. Jista' jittieħed kampjun ta' biċċa mill-pinna tad-denb u din tista' tiġi arkivjata f'dan il-waqt għall-verifika tas-sess ġenetiku (*dmy*) jekk din tkun mixtieqa. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jittieħed kampjun tat-tessut biex tiġi ripetuta l-analiżi tad-*dmy* għall-verifika tas-sess ġenetiku ta' ħuta speċifika. Il-kavità tal-ġisem tinfetaħ biex tkun tista' ssir perfużjoni b'fissattivi xierqa (eż. ta' Davidson) qabel it-tgħaddis tal-ġisem sħiħ fil-fissattiv. Madankollu, jekk jitwettaq pass xieraq ta' permeabilizzazzjoni qabel il-fissazzjoni, il-kavità tal-ġisem ma jkollhiex bżonn tinfetaħ.

Istopatoloġija

49. Kull ħuta tiġi evalwata istoloġikament għall-patoloġija fit-tessut gonadali (30); (29). Kif imsemmi fil-paragrafu 33, punti ta' tmiem mekkanistiċi oħra evalwati f'dan l-assaġġ (jiġifieri l-VTG, l-SSCs u ċerti effetti tal-istopatoloġija gonadali) jistgħu jkunu influwenzati minn tossiċitajiet sistemiċi jew oħrajn. Konsegwentement, l-istopatoloġija tal-fwied u tal-kliewi tista' tiġi vvalutata wkoll f'dettall biex jinftiehem aħjar kwalunkwe rispons f'punti ta' tmiem mekkanistiċi. Madankollu, jekk ma jsirux dawn l-evalwazzjonijiet dettaljati, anormalitajiet grossi osservati b'mod inċidentali matul l-evalwazzjoni istopatoloġika xorta waħda għandhom jiġu nnotati u rapportati. "Il-qari 'l isfel" mill-ogħla grupp tat-trattament (meta mqabbel mal-kontroll) għal trattament b'ebda effett jista' jiġi kkunsidrat, iżda hu rakkomandat li tiġi kkonsultata l-gwida dwar l-istopatoloġija (29). Tipikament, il-kampjuni kollha jiġu proċessati/sezzjonati, u wara dan jinqraw mill-patologu. Jekk jintuża approċċ ta' "qari 'l isfel", hu nnotat li l-proċedura Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) tuża l-aspettattiva li hekk kif jiżdiedu l-livelli tad-doża, l-impatt bijoloġiku (il-patoloġija) jiżdied ukoll. Għaldaqstant, wieħed jitlef is-saħħa jekk iħares biss lejn doża għolja waħda mingħajr ebda doża intermedja. Jekk l-analiżi statistika ma tkunx neċessarja biex jiġi determinat li d-doża ma għandha ebda effett, dan l-approċċ jista' jkun aċċettabbli. Il-fenotip tal-gonadi jinkiseb b'din l-evalwazzjoni wkoll

Osservazzjonijiet oħra

50. Il-MEOGRT jipprovdi *data* li tista' tintuża (eż. f'approċċ tal-piż ta' evidenza) biex jiġu evalwati fl-istess ħin tal-anqas żewġ tipi ġenerali ta' perkorsi tal-eżitu avvers (AOPs) li jintemmu f'indeboliment riproduttiv: (a) perkorsi medjati bl-endokrina li jinvolvu interferenza tal-assi endokrinali ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG); u, (b) perkorsi li jikkawżaw tnaqqis fis-sopravivenza, fit-tkabbir (tul u piż), u fir-riproduzzjoni permezz ta' tossiċità medjata mhux permezz tal-endokrina. Il-punti ta' tmiem tipikament jitkejlu f'testijiet tat-tossiċità kronika bħat-test taċ-ċiklu tal-ħajja sħiħ u t-test tal-istadju bikri tal-ħajja wkoll huma inklużi f'dan it-test u jistgħu jintużaw biex jiġu evalwati l-perikli miġjuba kemm minn modalitajiet ta' azzjoni tossiċi medjati mhux mill-endokrina kif ukoll minn perkorsi tat-tossiċità medjati mill-endokrina. Matul it-test, l-osservazzjonijiet tal-imġiba għandhom isiru ta' kuljum, u kwalunkwe mġiba mhux tas-soltu għandha tiġi notata. Barra minn hekk, kwalunkwe mortalità għandha tiġi reġistrata u s-sopravivenza sal-qtil tal-ħut (ġimgħa 6/7 tat-test), is-sopravivenza wara l-qtil sal-kampjunar subadult (f'9-10 wpf), u s-sopravivenza mit-tqegħid f'pari sal-kampjunar tal-ħut adult għandhom jiġu kkalkolati.

Tabella 1

Ħarsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-MEOGRT (*)

Stadju tal-ħajja	Punt ta' tmiem	Ġenerazzjoni
Embrijun (2 wpf)	Tifqis (% u żmien sat-tifqis)	F1, F2
Ħut li għadu qed jikber (4 wpf)	Sopravivenza	F1
Subadult (9 jew 10 wpf)	Sopravivenza	F1
	Tkabbir (tul u piż)	
	Vitelloġenina (mRNA jew proteina)	
	Karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinna anali)	
	Proporzjon tas-sess estern	
	Żmien għall-1el riproduzzjoni	
Adult (12-14-il wpf)	Riproduzzjoni (fekondità u fertilità)	F0, F1
Adult (15 wpf)	Sopravivenza	F1
	Tkabbir (tul u piż)	
	Karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinna anali)	
	Istopatoloġija (gonad, fwied, kilwa)	

(*) Dawn il-punti ta' tmiem għandhom jiġu analizzati statistikament

KRONOLOĠIJA

51. Kronoloġija għall-MEOGRT murija fit-Tabella 2 turi t-test. L-MEOGRT tinkludi 4 ġimgħat esponiment għal adulti F0 u 15-il ġimgħa esponiment għall-ġenerazzjoni F1, u perjodu ta' esponiment għat-tieni ġenerazzjoni (F2), sat-tifqis (2 wpf). L-attività matul l-MEOGRT hi spjegata fl-Appendiċi 9.

Tabella 2

Kronoloġiji tal-punti ta' tmiem tal-esponiemnt u tal-kejl għall-MEOGRT

Kronoloġija tal-Esponiment u tal-Punti ta' Tmiem tal-MEOGRT

F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																		1	2
Ġimgħa tat-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Stadju tal-Ħajja					**Embrijun**					**Larva**					**Ħut li għadu qed jikber**			**Subadult**	**Adult**
Punti Aħħarin																			
Fekondità	F_0														F_1				
Fertilità	F_0														F_1				
Bokkaport					F_1														F_2
Sopravivenza						F_1						F_1						F_1	
Tkabbir				F_0								F_1						F_1	
Vitelloġenina												F_1							
Sess sekondarju												F_1						F_1	
Istopatoloġija																		F_1	
Ġimgħa tat-Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- Disinn sperimentali għandu seba' gruppi ta' repliki
  - Ħamsa għat-trattamenti bis-sustanza kimika tat-test
  - Tnejn għat-trattamenti tal-kontroll (erba' jekk jintuża solvent)
- Disinn fi ħdan il-grupp
  - Tnax-il replika għar-riproduzzjoni, patoloġija adulta u SSC (Ġmt 10 sa 18)
  - Sitt repliki għat-tifqis, sopravivenza, Vtg; u - SSC u tkabbir subadulti (Ġmt 1 sa 9)

SSC: karatteristiċi sesswali sekondarji; Ġmt: ġimgħat; Vtg: vitelloġenina

DATA U RAPPORTAR

Analiżi statistika

52. Peress li s-sess ġenotipiku jiġi determinat għall-ħut kollu tat-test, id-*data* għandha tiġi analizzata għal kull sess ġenotipiku b'mod separat (jiġifieri rġiel XY u nisa XX). Nuqqas milli jsir hekk inaqqas bil-bosta s-saħħa statistika ta' kwalunkwe analiżi. Idealment, l-analiżijiet statistiċi tad-*data* għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument tal-OECD dwar l-Approċċi Kurrenti fl-Analiżi Statistika tad-*Data* dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (32). L-Appendiċi 10 jipprovdi gwida ulterjuri għall-Analiżi Statistika.

53. Id-disinn tat-test u l-għażla tat-testijiet statistiċi għandhom jippermettu saħħa adegwata li jiġu individwati tibdiliet ta' importanza bijoloġika f'punti ta' tmiem fejn trid tiġi rapportata NOEC (32). Ir-rapportar tal-konċentrazzjonijiet tal-effett u l-parametri rilevanti jista' jiddependi fuq il-qafas regolatorju. Għandu jkun identifikat it-tibdil perċentwali f'kull punt ta' tmiem li jkun importanti għad-detezzjoni jew għall-istima. Id-disinn sperimentali għandu jitfassal biex jippermetti dan. Mhuwiex probabbli li l-istess tibdil perċentwali japplika għall-punti ta' tmiem kollha, lanqas ma hu probabbli li jkun jista' jitfassal esperiment fattibbli li jissodisfa dawn il-kriterji għall-punti ta' tmiem kollha, u għalhekk hu importanti li wieħed jiffoka fuq il-punti ta' tmiem li huma importanti għall-esperiment rispettiv biex l-esperiment jitfassal kif xieraq. Flow diagram statistiku u l-gwida huma disponibbli fl-Appendiċi 10 biex iservu ta' għajnuna fit-trattament tad-*data* u fl-għażla tal-aktar test statistiku jew mudell xieraq li għandu jintuża. Jistgħu jintużaw approċċi statistiċi oħra, dment li jkunu xjentifikament ġustifikati.

54. Se jkun neċessarju li l-varjazzjonijiet jiġu analizzati f'kull sett ta' repliki bl-użu ta' analiżi tal-varjanza jew proċeduri b'tabella ta' kontinġenza u li jintużaw metodi ta' analiżi statistika xierqa u suffiċjenti abbażi ta' din l-analiżi. Biex isir tqabbil multiplu bejn ir-riżultati fil-konċentrazzjonijiet individwali u dawk għall-kontrolli, il-proċedura ta' tendenza rigressiva (eż. it-test ta' Jonckheere-Terpstra) hi rakkomandata għal risponsi kontinwi. Meta d-*data* ma tkunx konsistenti ma' konċentrazzjoni-rispons monotoni, għandu jintuża t-test ta' Dunnett jew it-test ta' Dunn (wara trasformazzjoni adegwata tad-*data*, jekk ikun hemm bżonn).

55. Għall-fekondità, l-għadd tal-bajd isir kuljum, iżda jista' jiġi analizzat bħala l-għadd totali tal-bajd jew bħala kejl ripetut. L-Appendiċi 10 jipprovdi dettalji dwar kif jiġi analizzat dan il-punt ta' tmiem. Għad-*data* dwar l-istopatoloġija li tkun fil-forma ta' punteġġi tas-severità, ġie żviluppat test statistiku ġdid, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Għandu jiġi rapportat kwalunkwe punt ta' tmiem osservat fi trattamenti kimiċi li jkunu differenti b'mod sinifikanti minn kontrolli xierqa.

Kunsiderazzjonijiet għall-analiżi tad-*data*

Użu ta' livelli tat-trattament f'riskju

57. Jiġu kkunsidrati bosta fatturi meta jiġi stabbilit jekk replika jew trattament sħiħ jurux tossiċità ċara u għandhomx jitneħħew mill-analiżi. Tossiċità ċara hi definita bħala > 4 mortalitajiet fi kwalunkwe replika bejn it-3 wpf u d-9 wpf li ma jkunux jistgħu jiġu spjegati minn żball tekniku. Sinjali oħra ta' tossiċità ċara jinkludu emorraġija, imġiba anormali, xejriet tal-għawn anormali, anoressija u kwalunkwe sinjal kliniku ieħor ta' mard. Għal sinjali subletali ta' tossiċità, jista' jkun hemm bżonn ta' evalwazzjonijiet kwalitattivi, u dejjem għandha ssir referenza għall-grupp ta' kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni (ilma nadif biss). Jekk it-tossiċità ċara tkun evidenti fl-ogħla trattament(i), hu rakkomandat li dawk it-trattament jiġu ċċensurati mill-analiżi.

Kontrolli b'solvent

58. L-użu ta' solvent għandu jiġi kkunsidrat biss bħala l-aħħar rikors, wara li jkunu ġew ikkunsidrati l-għażliet l-oħra kollha ta' twassil. Jekk jintuża solvent, f'dak il-każ għandu jsir fl-istess ħin kontroll b'ilma ta' dilwizzjoni. Fi tmiem it-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent. Dan isir permezz ta' paragun statistiku tal-grupp ta' kontroll b'solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. L-aktar punti ta' tmiem relevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analiżi huma d-determinanti tat-tkabbir (piż), peress li dawn jistgħu jkunu affettwati permezz ta' tossiċitajiet ġeneralizzati. Jekk jinstabu differenzi statistikament sinifikanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-gruppi tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni u tal-kontroll b'solvent, għandu jintuża l-aħjar ġudizzju professjonali biex jiġi determinat jekk il-validità tat-test ħix f'riskju. Jekk iż-żewġ kontrolli jvarjaw, it-trattamenti esposti għas-sustanza kimika għandhom jitqabblu mal-kontroll b'solvent sakemm ma jkunx magħruf li jkun preferut it-tqabbil mal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn iż-żewġ gruppi tal-kontroll, hu rakkomandat li t-trattamenti esposti għas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mar-raggruppati (gurppi tal-kontroll b'solvent u bl-ilma ta' dilwizzjoni), sakemm ma jkunx magħruf li t-tqabbil mal-grupp tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni jew tal-kontroll b'solvent biss hu preferut.

Rapport tat-test

59. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test: l-għamla fiżika u, fejn relevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;

— *Data* dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika.

Sustanza monokostitwenti:

— id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

— identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impuritajiet bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

— ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test:

— L-isem xjentifiku, ir-razza jekk disponibbli, is-sors u l-metodu tal-ġbir tal-bajd fertilizzat, u l-immaniġġjar sussegwenti.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— Il-fotoperjodu/i;

— Id-disinn tat-test (eż. id-daqs tal-kompartiment, il-materjal u l-volum tal-ilma, in-numru ta' kompartimenti u ta' repliki tat-test, in-numru ta' mfaqqsa għal kull replika);

— Il-metodu ta' tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-frekwenza tat-tiġdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);

— Il-metodu li jintuża għad-dożaġġ tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompi, sistemi ta' dilwizzjoni);

— L-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu li permezz tiegħu nkisbu u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;

— Il-karatteristiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli tal-kloru residwu (jekk jitkejjel), il-karbonju organiku totali (jekk jitkejjel), is-solidi sospiżi (jekk jitkejlu), is-salinità tal-medium tat-test (jekk titkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir;

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom;

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, it-temperatura (ta' kuljum) u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;

— Informazzjoni dettaljata dwar it-tagħlif (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza).

Ir-riżultati:

— Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji dwar il-validazzjoni ġenerali;

— Id-*data* għall-kontroll (flimkien mal-kontroll b'solvent meta jintuża) u għall-gruppi tat-trattament kif ġej, it-tifqis (il-kapaċità ta' tifqis u ż-żmien sat-tifqis) għall-F1 u għall-F2, is-sopravivenza wara t-tifqis għall-F1, it-tkabbir (tul u piż tal-ġisem) għall-F1, is-sess ġenotipiku u d-differenzazzjoni sesswali (eż. karatteristiċi sesswali sekondarji fuq il-bażi tal-papilli tal-pinen anali u istoloġija gonadali) għall-F1, is-sess fenotipiku għall-F1, il-karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinen anali) għall-mRNA tal-*vtg* tal-F1 (jew il-proteina tal-VTG) għall-F1, valutazzjoni tal-istopatoloġija (gonad, fwied u kilwa) għall-F1 u r-riproduzzjoni (fekondità u fertilità) għall-F0, F1; (ara t-Tabelli 1 u 2).

— L-approċċ għall-analiżi statistika (analiżi ta' rigressjoni jew analiżi tal-varjanza) u t-trattament tad-*data* (it-testijiet statistiċi u l-mudelli użati);

— Il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) għal kull rispons ivvalutat;

— Il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) għal kull rispons ivvalutat (f'p = 0,05); L-EC_x għal kull rispons ivvalutat, jekk applikabbli, u l-intervalli ta' kunfidenza (eż. 90 % jew 95 %) u graff tal-mudell imdaħħal għall-kalkolu tagħha, il-pendil tal-kurva konċentrazzjoni rispons, il-formula tal-mudell ta' rigressjoni, il-parametri stmati tal-mudell u l-erruri standard tagħhom.

— Kwalunkwe devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ttestjar u devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni, u kunsiderazzjonijiet tal-konsegwenzi potenzjali fuq l-eżitu tat-test.

60. Għar-riżultati tal-kejlijiet tal-punti ta' tmiem, għandhom jiġu ppreżentati l-valuri medji u d-devjazzjonijiet standard tagħhom (kemm fuq bażi ta' repliki kif ukoll fuq bażi ta' konċentrazzjoni, jekk possibbli).

DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K u Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T u Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T u Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H u Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71-80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H i Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H u Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-*Tert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M u Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M u Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T u Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Disponibbli fuq: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P u McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Parigi.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ u Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE u Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ u Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K u Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K u Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Il-Kapitolu C.15 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Fuq Terminu Qasir fuq l-Istadji tal-Embrijuni u tal-Qixx fil-Borża.

(22) Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Ħut Fuq 21 Jum: Skrinjar fuq Terminu Qasir għal Attività Estroġenika u Androġenika, u Inibizzjoni tal-Aromataži.

(23) Il-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut.

(24) Il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness: Assaġġ dwar ir-Riproduzzjoni Fuq Terminu Qasir tal-Ħut.

(25) Il-Kapitolu C.47 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità fl-Istadju tal-Ħajja Bikrija.

(26) Il-Kapitolu C.49 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta fuq l-Embrijuni tal-Ħut (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L u Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M u Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M u Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245-251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S u Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (l-annessi għal din il-pubblikazzjoni jeżistu bħala dokument separat), OECD Publishing, Pariġi.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN u Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku

Fekondità = numru ta' bajd;

Fertilità = numru ta' bajd vijabbli/fekondità;

Tul sal-furketta (FL): jirreferi għat-tul mill-ponta tal-geddum sal-aħħar tax-xewk tal-pinen f'nofs id-denb u jintuża f'ħut fejn hu diffiċli li wieħed jgħid fejn tispiċċa l-kolonna vertebrali (www.fishbase.org)

Kapaċità ta' tifqis = imfaqqsa/numru ta' embrijuni mgħobbija f'inkubatur

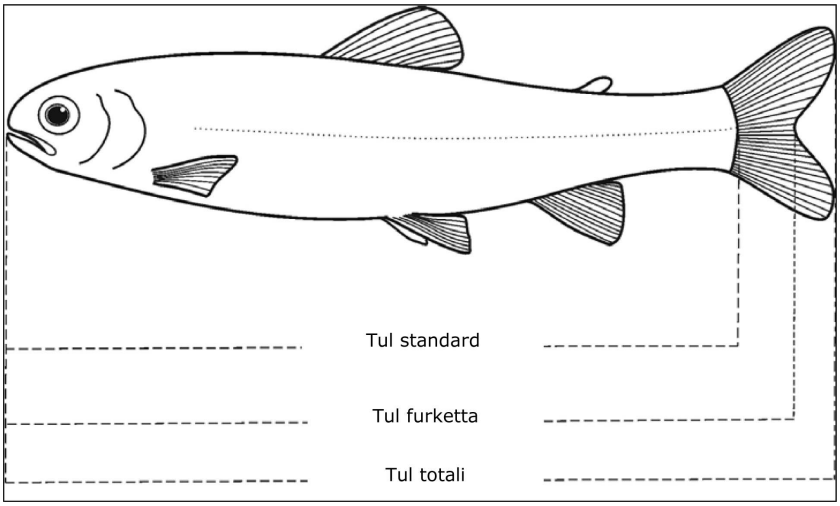
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

Tul standard (SL): jirreferi għat-tul ta' ħuta mkejjel mill-ponta tal-geddum sat-tarf ta' wara tal-aħħar vertebra jew sat-tarf ta' wara tal-porzjon midlaterali tal-hypural plate. Fi kliem sempliċi, dan il-kejl jeskludi t-tul tad-denb. (www.fishbase.org)

Tul totali (TL) jirreferi għat-tul mill-ponta tal-geddum sal-ponta tal-lobu itwal tad-denb, ġeneralment imkejjel bil-lobi kkumpressati tul il-linja tan-nofs. Dan hu kejl ta' linja dritta, li ma jitkejjilx fuq il-kurva tal-ġisem (www.fishbase.org)

Figura 1

Deskrizzjoni tat-tulijiet differenti użati



ECx: (Konċentrazzjoni effettiva għal effett ta' x %) hi l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organiżmi tat-test f'perjodu ta' esponiment partikolari meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC50 hi konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' esponiment definit.

Test bi fluss kontinwu ta' soluzzjonijiet tat-test fis-sistema tat-test matul id-durata tal-esponiment.

Assi HPG: assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali.

IUPAC: Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata.

Rata ta' tagħbija: Il-piż imxarrab tal-ħut skont il-volum ta' ilma.

Konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) hi l-anqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test li fiha tiġi osservata s-sustanza kimika biex ikollha effett statistikament sinifikanti (f'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha li jkunu ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż daqs jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni sħiħa dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC). L-Appendiċijiet 5 u 6 jipprovdu gwida.

Konċentrazzjoni Letali Medjana (LC50): hi l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li hi stmata li tkun letali għal 50 % tal-organiżmi tat-test fid-durata tat-test.

Konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) hi l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC, li meta mqabbla mal-kontroll, ma jkollha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$), f'perjodu ta' esponiment ddikjarat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Densità tal-istokkjar: L-għadd ta' ħut għal kull volum ta' ilma.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

VTG: Vitelloġenina hi prekursur tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment iseħħ f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

WPF: Ġimgħat ta' wara l-fertilizzazzjoni

Appendiċi 2

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjoni ta' limitu
Materja partikulata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromu	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Ħadid	1 µg/l
Ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

Appendiċi 3

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST GĦALL-MEOGRT

1. Speċijiet rakkomandati	Medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*)
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu
3. Temperatura tal-ilma	It-temperatura nominali tat-test hi ta' 25°C. It-temperatura medja tul it-test kollu f'kull tank hi ta' 24-26 °C.
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa' u ~150 lumen/m^2) (~150 lux).
5. Fotoperjodu	16-il siegħa dawl, tmien sigħat dlam
6. Rata ta' tagħbija	F0: żewġ adulti/replika; F1: imnedija b'massimu ta' 20 bajda (embrijun)/replika, imnaqqsa għal 12-il embrijun/replika fit-tifqis u mbagħad 2 adulti (pari tat-tgħammir XX-XY) fid-9-10 wpf għall-fażi riproduttiva
7. Volum minimu utilizzabbli tal-kompartiment tat-test	1,8 l (eż., daqs tal-kompartiment tat-test: 18x9x15-il cm)
8. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Minimu ta' ħames drabi ta' tiġdid tal-volum/jum sa 16-il darba ta' tiġdid tal-volum/jum (jew fluss ta' 20 ml/min)
9. Età tal-organiżmi tat-test fil-bidu	F0: > 12-il wpf iżda hu rakkomandat li ma jinqabżux is-16-il wpf
10. In-numru ta' organiżmi għal kull replika	F0: 2 ħutiet (par ta' raġel u mara); F1: massimu ta' 20 ħuta (bajd)/replika (prodotti mill-pari tat-tgħammir tal-F0 u tal-F1).
11. In-numru ta' trattamenti	Ħames trattamenti bis-sustanza kimika tat-test flimkien mal-kontroll(i) xieraq/xierqa
12. In-numru ta' repliki għal kull trattament	Minimu ta' sitt repliki għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u minimu ta' 12-il replika għall-kontroll, u għall-kontroll b'solvent, jekk użati (in-numru ta' repliki jirdoppja fi ħdan il-fażi tar-riproduzzjoni fil-F1)
13. In-numru ta' organiżmi għal kull test	Minimu ta' 84 ħuta fl-F0 u 504 fl-F1. (Jekk jintuża kontroll b'solvent, 108 ħutiet fl-F0 u 648 ħuta fl-F1). L-unità li tingħadd hi l-postelewteroembrijun.
14. Reġim tal-għalf	Il-ħut jintema' l-gambli tal-ilma mielaħ, *Artemia* spp., (nauplii li jkollu 24 siegħa) *ad libitum*, supplimentat b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn (Skeda ta' tagħlif bħala eżempju biex jiġu żgurati tkabbir u żvilupp adegwati b'sostenn tar-riproduzzjoni robusta tista' tinstab fl-Appendiċi 5).
15. Ossiġenazzjoni	Ebda sakemm l-ossiġenu dissolt ma joqrobx lejn < 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja
16. Ilma ta' dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif.

17. Perjodu ta' esponiment	Primarjament 19-il ġimgħa (mill-F0 sat-tifqis tal-F2)
18. Punti ta' tmiem bijoloġiċi (primarji)	Kapaċità ta' tifqis (F1 u F2); sopravivenza (F1, mit-tifqis sar-4 wpf (tmiem il-larva/bidu tal-fażi tal-ħut li għadu qed jikber), mir-4 sad-9 (jew l-10) wpf (bidu tal-fażi tal-ħut li għadu qed jikber sa subadult) u minn 9 sa 15-il wpf (subadult sa terminazzjoni tal-adult)); tkabbir (F1, tul u piż f'9 u 15-il wpf); karatteristiċi sesswali sekondarji (F1, papilli tal-pinen anali fid-9 u fil-15-il wpf); vitelloġenina (F1, mRNA tal-*vtg* jew proteina tal-VTG fil-15-il wpf); sess fenotipiku (F1, permezz tal-istoloġija gonadali fil-15-il wpf); riproduzzjoni (F0 u F1, il-fekondità u l-fertilità għal 21 jum); ħin sar-riproduzzjoni (F1); u istopatoloġija (F1, gonad, fwied u kilwa fil-15-il wpf)
19. Il-kriterji ta' validità tat-test	Ossiġenu dissolt ta' ≥ 60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja; temperatura medja tal-ilma ta' 24-26 °C matul it-test; riproduzzjoni b'suċċess ta' ≥ 65 % tan-nisa fil-kontroll(i); fekondità medja ta' kuljum ta' ≥ 20 bajd fil-kontroll(i); kapaċità ta' tifqis ta' ≥ 80 % (medja) fil-kontrolli (f'kull waħda mill-F1 u mill-F2); sopravivenza wara t-tifqis sat-3 wpf ta' ≥ 80 % (medja) u minn 3 wpf sat-terminazzjoni għall-ġenerazzjoni ta' ≥ 90 % (medja) fil-kontrolli (F1), il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni għandhom jinżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla.

Appendiċi 4

GWIDA DWAR IL-VALURI TIPIĊI TAL-KONTROLL

Ta' min jinnota li dawn il-valuri tal-kontroll huma bbażati fuq numru limitat ta' studji ta' validazzjoni, u jistgħu jkunu soġġetti għall-emendar fid-dawl ta' esperjenza ulterjuri.

Tkabbir

Il-kejlijiet tal-piż u tat-tul jittieħdu għall-ħut kollu fil-kampjun fid-9 (jew fl-10) u fil-15-il ġimgħa wara l-fertilizzazzjoni (wpf). Is-segwitu ta' dan il-protokoll irendi l-piżijiet imxarrba mistennija fid-9 wpf ta' 85-145 mg għall-irġiel u ta' 95-150 mg għan-nisa. Il-piżijiet mistennija fil-15-il wpf huma ta' 250-330 mg għall-irġiel u ta' 280-350 mg għan-nisa. Filwaqt li jista' jkun hemm devjazzjonijiet sostanzjali minn dawn il-meded għal ħut individwali, piżijiet medji tal-kontroll sostanzjalment barra minn dawn il-meded, speċjalment anqas, ikunu jissuġġerixxu problemi fit-tagħlif, fil-kontroll tat-temperatura, fil-kwalità tal-ilma, mard jew xi taħlita ta' dawn il-fatturi.

Tifqis

Is-suċċess tat-tifqis fil-kontrolli tipikament ikun madwar id-90 %, madankollu mhumiex rari valuri baxxi sa 80 %. Suċċess tat-tifqis ta' anqas minn 75 % jista' jindika aġitazzjoni insuffiċjenti tal-bajd tal-iżvilupp jew attenzjoni inadegwata fl-immaniġġjar tal-bajd bħan-nuqqas ta' tneħħija fil-ħin tal-bajd mejjet li jwassal għal infestazzjoni fungali.

Sopravivenza

Ir-rati ta' sopravivenza sat-3 wpf mit-tifqis u wara t-3 wpf normalment ikunu ta' 90 % jew aktar għall-kontrolli iżda r-rati ta' sopravivenza fl-istadji bikrin tal-ħajja li jiżlu sa 80 % għall-kontrolli mhumiex allarmanti. Rati ta' sopravivenza fil-kontrolli ta' anqas minn 80 % ikunu ta' tħassib u jistgħu jindikwa tindif insuffiċjenti tal-akkwarji li jwassal għal telf tal-ħut larvali permezz ta' mard jew minħabba soffokazzjoni minħabba livelli baxxi ta' ossiġenu dissolt. Il-mortalità tista' sseħħ ukoll minħabba korriment matul it-tindif tat-tankijiet u minħabba t-telf ta' ħut larvali fis-sistema tad-drenaġġ tat-tank.

Il-ġene vitelloġenina

Filwaqt li l-livelli assoluti tal-ġene *vitelloġenina* (*vtg*), espressi bħala kopji/ng tal-mRNA totali, jistgħu jvarjaw ħafna bejn il-laboratorji minħabba l-proċeduri u l-istrumenti użati, il-proporzjon tal-*vtg* għandu jkun madwar 200 darba akbar fin-nisa tal-kontroll kontra l-irġiel tal-kontroll. Mhijiex xi ħaġa rari li dan il-proporzjon ikun għoli bejn 1 000 u 2 000, iżda proporzjonijiet anqas minn 200 huma suspettużi u jistgħu jindikaw problemi ta' kontaminazzjoni fil-kampjun jew problemi bil-proċedura u/jew bir-reaġenti użati.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

Għall-irġiel, il-medda normali ta' Karatteristiċi Sesswali Sekondarji, definiti bħala n-numru totali ta' segmenti fir-raj tal-pinen tal-papilli tal-pinen anali, hi ta' 40-80 segment fid-9-10 wpf. Sal-15-il wpf, il-medda għall-irġiel tal-kontroll għandha tkun ta' madwar 80-120 u ta' 0 għan-nisa tal-kontroll. Għal raġunijiet mhux spjegati, f'każijiet rari ċerti rġiel ma jkollhom ebda papilla preżenti sad-9 wpf iżda peress li l-irġiel tal-kontroll kollha jiżviluppaw papilli sal-15-il wpf, dan aktarx li jkun ikkawżat minn żvilupp tardiv. Il-preżenza ta' papilli fin-nisa tal-kontroll tindika l-preżenza ta' rġiel XX fil-popolazzjoni.

Irġiel XX

L-inċidenza normali ta' sfond ta' rġiel XX fil-koltura tidher li hi ta' madwar 4 % jew anqas f'25 °C bl-inċidenza li tiżdied aktar ma tiżdied it-temperatura. Għandhom jittieħdu passi biex jiġi minimizzat il-proporzjon ta' rġiel XX fil-popolazzjoni. Peress li l-inċidenza ta' rġiel XX tidher li għandha komponent ġenetiku u, għalhekk, tintiret, il-monitoraġġ tal-istokk tal-koltura u l-iżgurar li l-irġiel XX ma jintużawx għall-propagazzjoni tal-istokk tal-koltura huma mezz effettiv kif titnaqqas l-inċidenza tal-irġiel XX fil-popolazzjoni.

Attività ta' riproduzzjoni

L-attività ta' riproduzzjoni fir-repliki tal-kontroll għandha tiġi ssorveljata ta' kuljum qabel ma ssir il-valutazzjoni tal-fekondità. Il-pari tal-kontroll jistgħu jiġu vvalutati b'mod kwalitattiv viżwalment għal evidenza ta' attività ta' riproduzzjoni. Sat-12-14-il wpf, ħafna mill-pari tal-kontroll għandhom ikunu qed jirriproduċu. Numri baxxi ta' pari li jirriproduċu sa dan iż-żmien jindikaw problemi potenzjali fis-saħħa, fil-maturità jew fil-benessri tal-ħut.

Fekondità

Ġeneralment, medaka f'saħħithom, magħlufa sew ta' 12-14-il wpf jirriproduċu kuljum, u jipproduċu fil-medda ta' 15 sa 50 bajda kull jum. Il-produzzjoni tal-bajd għal 16 mill-24 par tat-tgħammir tal-kontroll rakkomandati (> 65 %) għandha tipproduċi aktar minn 20 bajda għal kull par kull jum u tista' tilħaq sa madwar 40 bajda kull jum. Anqas minn dan l-ammont jista' jindika pari tar-riproduzzjoni immaturi, mhux magħlufa kif suppost jew mhux f'saħħithom.

Fertilità

Il-perċentwal ta' bajd fertili għall-pari tar-riproduzzjoni tal-kontroll tipikament ikun fil-medda ta' 90 % b'valuri fil-parti medja sa superjuri tad-disgħinijiet li mhumiex rari. Rati tal-fertilità ta' anqas minn 80 % għall-bajd tal-kontroll huma suspettużi u jistgħu jindikaw individwi mhux f'saħħithom jew kundizzjonijiet tal-koltura mhux ideali.

Appendiċi 5

EŻEMPJU TA' SKEDA TAT-TAGĦLIF

Eżempju ta' skeda tat-tagħlif biex jiġu żgurati tkabbir u żvilupp adegwati b'sostenn tar-riproduzzjoni robusta hu muri fit-Tabella 1. Devjazzjonijiet minn din l-iskeda ta' tagħlif jistgħu jkunu aċċettabbli, iżda hu rakkomandat li dawn jiġu ttestjati biex jiġi verifikat li jkunu osservati tkabbir u riproduzzjoni aċċettabbli. Biex tiġi segwita l-iskeda ta' tagħlif suġġerita, il-piż xott tal-gamblu tal-ilma mielaħ għal kull volum ta' sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ irid jiġi determinat qabel ma jinbeda t-test. Dan jista' jsir bl-użin ta' volum differenti tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ li tkun tnixxfet għal 24 siegħa f'60 °C fuq twaġen li jkunu ntiżnu minn qabel. Biex jingħata kont lill-piż tal-imluħ fis-sospensjoni magħquda, volum identiku tal-istess soluzzjoni tal-melħ użata fis-sospensjoni magħquda għandu jitnixxef, jintiżen u jitnaqqas ukoll mill-piż tas-sospensjoni magħquda xxottata tal-gamblu tal-ilma mielaħ. Inkella, il-gamblu tal-ilma mielaħ jista' jiġi ffiltrat u jitlaħlaħ b'ilma distillat qabel ma jiġi xxottat, u b'hekk tiġi eliminata l-ħtieġa li jitkejjel il-piż ta' imbjank tal-melħ. Din l-informazzjoni tintuża biex tikkonverti l-informazzjoni fit-Tabella minn piż xott tal-gamblu tal-ilma mielaħ għall-volum tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ li jrid jintema' lil kull ħuta. Barra minn hekk, hu rakkomandat li l-alikwoti tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ jintiżnu ta' kull ġimgħa biex jiġi verifikat il-piż xott korrett tal-gamblu tal-ilma mielaħ magħluf.

Tabella 1

Eżempju ta' skeda tat-tagħlif

Żmien (wara t-tifqis)	Gamblu tal-Ilma Mielaħ (mg piż xott/ħuta/jum)
Jum 1	0,5
Jum 2	0,5
Jum 3	0,6
Jum 4	0,7
Jum 5	0,8
Jum 6	1,0
Jum 7	1,3
Jum 8	1,7
Jum 9	2,2
Jum 10	2,8
Jum 11	3,5
Jum 12	4,2
Jum 13	4,5

Żmien (wara t-tifqis)	Gamblu tal-Ilma Mielaħ (mg piż xott/ħuta/jum)
Jum 14	4,8
Jum 15	5,2
Jiem 16-21	5,6
Ġimgħa 4	7,7
Ġimgħa 5	9,0
Ġimgħa 6	11,0
Ġimgħa 7	13,5
Ġimgħa 8-sagrifiċċju	22,5

Appendiċi 6

EŻEMPJI TA' KOMPARTIMENT TA' INKUBAZZJONI TAL-BAJD

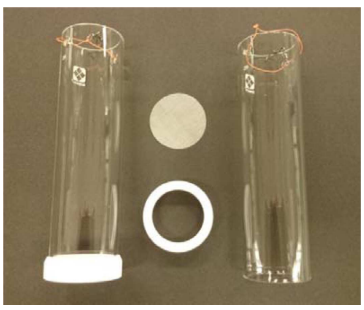
Eżempju A





Dan l-inkubatur jikkonsisti f'tubu ċentrifugu tal-ħġieġ transettat, konness b'pajp tal-azzar inossidabbli u miżmum f'postu bit-tapp tal-kamin ċentrifugu. Tubu żgħir tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli jipproġetta minn ġot-tapp u jitqiegħed qrib il-qiegħ ittondjat, filwaqt li jifforma bżieżaq tal-arja bil-galbu biex jissospendi l-bajd u jnaqqas it-trażmissjoni bejn il-bajd ta' infezzjonijiet fungali saprofitiċi filwaqt li jiffaċilita wkoll l-iskambju ta' sustanzi kimiċi bejn l-inkubatur u t-tank kontenitur.

Eżempju B





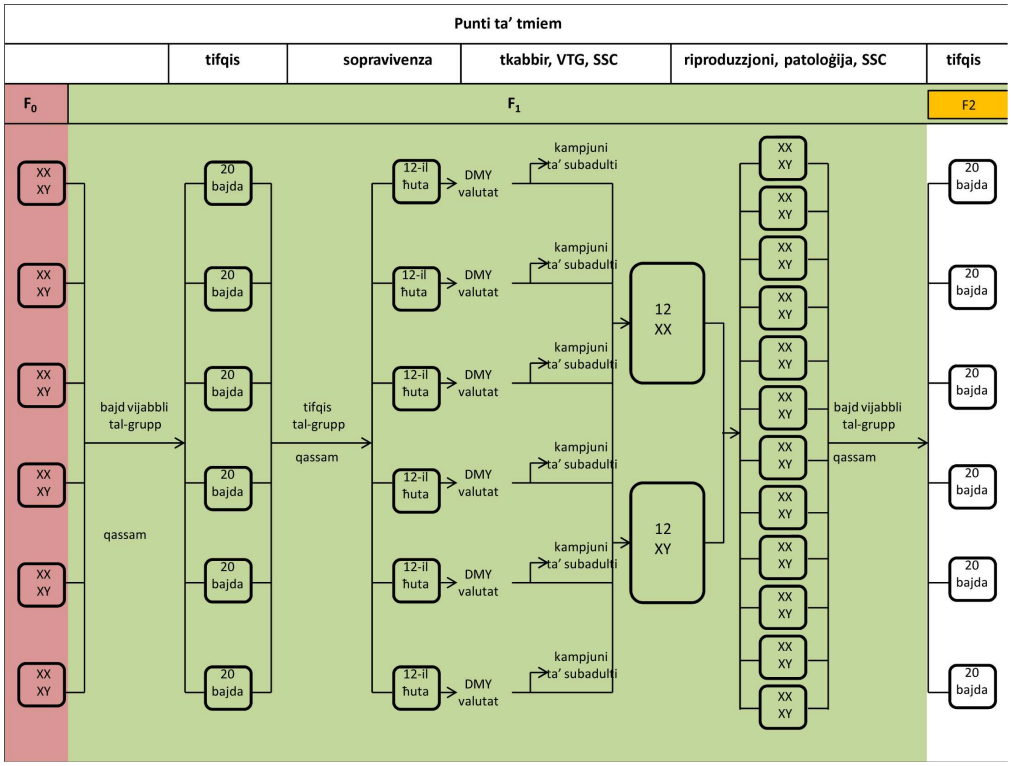
Dan l-inkubatur jikkonsisti f'korp ċilindriku tal-ħġieġ (dijametru ta' 5 cm u għoli ta' 10 cm) u xibka tal-wajer inossidabbli (xibka ta' 0,25 φ u 32) li titqabbad mal-qiegħ tal-korp b'ċirku PTFE. L-inkubaturi jiġu sospiżi mill-iżbarra tal-irfigħ għat-tankijiet, u jitħeżżu vertikalment (amplitudni ta' madwar 5 cm) f'ċiklu xieraq (bejn wieħed u ieħor darba kull 4 sekondi) għall-bajd tal-medaka.

Appendiċi 7

DIJAGRAMMA SKEMATIKA GĦAR-RAGGRUPPAR U GĦALL-POPOLAMENT TAR-REPLIKI FI ĦDAN IL-METODU TA' TTESTJAR MEOGRT

Figura 1

Ir-raggruppament u r-ripopolament tar-repliki fi ħdan l-MEOGRT. Il-figura tirrappreżenta trattament wieħed jew nofs ta' kontroll. Minħabba r-raggruppament, l-identità tar-repliki mhix kontinwa matul it-test. Kun af li t-terminu bajd jirreferi għal bajd vijabbli fertilizzati (ekwivalenti għal embrijuni).



Trattamenti u Replika.

Il-metodu ta' ttestjar jirrakkomanda ħames trattamenti tas-sustanza kimika tat-test li jużaw materjal ta' grad tekniku u kontroll negattiv. In-numru ta' repliki għal kull trattament ma jibqax kostanti matul l-MEOGRT, u n-numru ta' repliki fit-trattament tal-kontroll hu d-doppju ta' kwalunkwe trattament uniku bis-sustanza kimika tat-test. F'F0, kull trattament bis-sustanza kimika tat-test ikollu sitt repliki filwaqt li t-trattament bil-kontroll negattiv ikollu 12-il replika. Is-solventi huma ferm skoraġġuti, u jekk jintużaw, fir-rapport tal-MEOGRT għandha tiġi inkluża ġustifikazzjoni kemm għall-użu ta' solvent kif ukoll għall-għażla tas-solvent. Barra minn hekk, jekk jintuża solvent, ikun hemm bżonn ta' żewġ tipi ta' kontroll: a) kontroll b'solvent, u b) kontroll negattiv. Dawn iż-żewġ gruppi ta' kontroll ilkoll għandhom jikkonsistu f'komplement sħiħ ta' repliki fil-punti kollha fi ħdan l-iskeda ta' żmien tal-MEOGRT. Matul l-iżvilupp kollu tal-organiżmi tat-test fil-ġenerazzjoni F1 (u F2, sat-tifqis), din l-istruttura tar-repliki tibqa' l-istess. Madankollu, fl-istadju adult meta jiġu fformati l-pari tat-tgħammir tal-F1, in-numru ta' repliki ta' pari tar-riproduzzjoni għal kull trattament jiġi rdoppjat b'mod ottimali; għaldaqstant, ikun hemm sa 12-il par ta' repliki f'kull trattament bis-sustanza kimika tat-test u 24 par ta' repliki fil-grupp tal-kontroll (u 24 par ta' repliki oħra fil-kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn). Id-determinazzjoni tat-tifqis mill-embrijuni riprodotti mill-pari tal-F1 issir bl-istess struttura ta' repliki kif saret għall-embrijuni riprodotti mill-pari tal-F0, jiġifieri inizjalment sitt repliki għal kull trattament bis-sustanza kimika tat-test u 12-il replika fil-grupp(i) tal-kontroll.

Appendiċi 8

GĦADD TAL-PAPILLI TAL-PINEN ANALI

Materjali u Reaġenti Ewlenin

— Mikroskopju għad-dissezzjoni (b'kamera mqabbda fakultattiva)

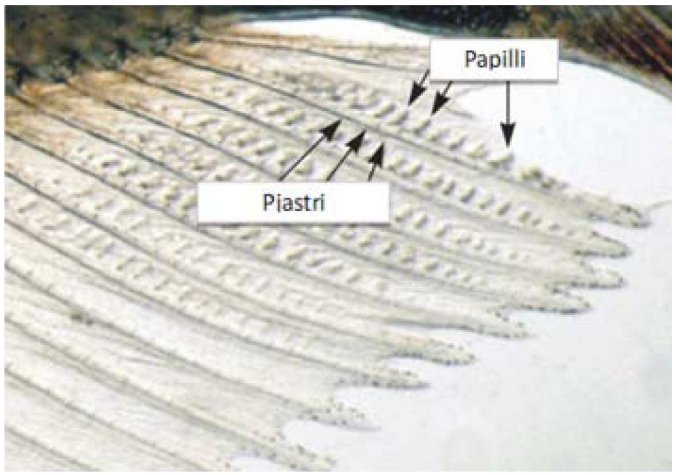
— Fissattiv (eż. ta' Davidson (ta' Bouin mhuwiex rakkomandat)), jekk ma jingħaddux mill-immaġni

Proċeduri

Wara n-nekroskopija, għandha tittieħed immaġni tal-pinna anali għall-għadd konvenjenti tal-papilli tal-pinen anali. Filwaqt li t-teħid ta' immaġnijiet hu l-metodu rakkomandat, il-pinna anali tista' tiġi ffissata b'fissattiv ta' Davidson jew b'fissattiv xieraq ieħor għal madwar minuta (1). Importanti li l-pinna anali tinżamm ċatta matul il-fissazzjoni biex il-papilli jkunu jistgħu jingħaddu aktar faċilment. Il-karkassa bil-pinna anali tista' tinħażen f'fissattiv ta' Davidson jew f'fissattiv xieraq ieħor sakemm tiġi analizzata. Għodd in-numru ta' pjastri konġunti (ara l-**Figura 1**) bil-papilli li jinfdu mill-marġni ta' wara tal-pjastra konġunta.

Figura 1

Papilli tal-pinna anali



Appendiċi 9

SKEDA TA' ŻMIEN DETTALJATA TAL-MEOGRT

Ġimgħat tat-Test 1-3 (F0)

Il-ħut tal-ġenerazzjoni tal-F0 li jirriproduċi u li jissodisfa l-kriterji tal-għażla (ara l-para. 16-20) jiġi espost għal tliet ġimgħat biex il-gameti fl-iżvilupp u t-tessuti gonadali jkunu esposti għas-sustanza kimika tat-test. Kull tank ta' repliki jospita par wieħed ta' ħut tat-tgħammir (par tat-tgħammir ta' mara XX u ta' raġel XY). Il-bajd riprodott jinġabar, jingħadd u jiġi vvalutat għall-fertilità għal 21 jum konsekuttiv, b'bidu fil-Jum 1 tat-Test.

Ġimgħa 4 tat-Test (F0 u F1)

Idealment il-bajd fertilizzat u vijabbli (embrijuni) jinġabar f'jum wieħed; madankollu, jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni, l-embrijuni jistgħu jinġabru fuq jumejn. Jekk jinġabru wara jumejn, l-embrijuni kollha fi ħdan it-trattamenti li jkunu nġabru fl-ewwel jum jiġu raggruppati ma' dawk miġbura fit-tieni jum. Imbagħad, l-embrijuni raggruppati totali għal kull trattament jiġu distribwiti b'mod aleatorju f'kull wieħed mill-inkubaturi ta' repliki f'20 embrijun għal kull inkubatur. Il-mortalitajiet tal-bajd fertilizzat (embrijuni) jiġu verifikati u reġistrati ta' kuljum. Il-bajd mejjet jitneħħa mill-inkubaturi (mewt f'bajd fertilizzat jista' jiġi denotat, b'mod partikolari fl-istadji bikrin, b'telf notevoli ta' translučenza u tibdil fil-kulur, ikkawżat minn koagulazzjoni u/jew preċipitazzjoni tal-proteina, li jwasslu għal dehra opaka bajda; OECD 2010).

Nota: Jekk trattament wieħed ikun jeħtieġ it-tieni jum ta' ġbir, it-trattamenti kollha (inklużi l-kontrolli) iridu jsegwu din il-proċedura. Jekk wara t-tieni jum tal-ġbir ikun hemm numri inadegwati ta' embrijuni fi ħdan trattament biex jitgħabbew 20 embrijun għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' embrijuni mgħobbija fi ħdan dak it-trattament speċifiku għal 15-il embrijun għal kull inkubatur. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni biex jitgħabbew 15 għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' inkubaturi ta' repliki sakemm ikun hemm biżżejjed embrijuni għal 15 għal kull inkubatur. Barra minn hekk, jistgħu jiżdiedu aktar pari tat-tgħammir għal kull trattament u jistgħu jiżdiedu l-kontrolli f'F0 biex jipproduċu aktar bajd bl-għan li jintlaħqu l-20 rakkomandati għal kull replika.

Fil-Jum 24 tat-Test, il-pari tat-tgħammir F0 jinqatlu bl-ewtanażja u jittieħed rekord tal-piż u tat-tul. Jekk ikun hemm bżonn, il-pari tat-tgħammir F0 jistgħu jinżammu għal jum/jumejn addizzjonali biex terġa' tinbeda l-F1.

Ġimgħat tat-Test 5-6 (F1)

Jum sa jumejn qabel il-bidu antiċipat tat-tifqis, waqqaf jew naqqas l-aġitazzjoni tal-bajd tal-inkubazzjoni biex tħaffef it-tifqis. Peress li l-embrijuni jfaqqsu f'kull jum, l-imfaqqsa jiġu raggruppati skont it-trattament u jitqassmu b'mod sistematiku f'kull tank tal-larva ta' repliki fi ħdan trattament speċifiku b'mhux aktar minn 12-il imfaqqas. Dan isir bl-għażla aleatorja tal-imfaqqsa u bit-tqegħid ta' mfaqqas wieħed f'repliki suċċessivi fi grupp indiskriminat, bi proċedimenti skont l-ordni fir-repliki ta' trattament speċifiċi sakemm ir-repliki kollha fi ħdan it-trattament ikollhom 12-il imfaqqas. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed imfaqqsa biex jimtlew ir-repliki kollha, ara li l-akbar numru possibbli ta' repliki jkollhom 12-il imfaqqas biex jibdew il-fażi F1.

Il-bajd li ma jkunx għadu faqqas sad-doppju tal-jum medjan tal-kontroll jitqies mhux vijabbli u jintrema. In-numru ta' mfaqqsa jiġi reġistrat u s-suċċess tat-tifqis (il-kapaċità ta' tifqis) jiġi kkalkolat f'kull replika.

Ġimgħat tat-Test 7-11 (F1)

Is-sopravivenza ta' ħut larvali tiġi verifikata u reġistrata kuljum fir-repliki kollha. Fil-Jum 43 tat-Test, in-numru ta' ħut li jkun għadu ħaj f'kull replika jiġi reġistrat kif ukoll in-numru tinizjali ta' mfaqqsa mqiegħda fir-replika (normalment tnax). Dan jippermetti għall-kalkolu tas-sopravivenza perċentwali mit-tifqis sal-istadju subadult.

Ġimgħa tat-Test 12 (F1)

Fil-Jiem 78-85 tat-Test, jittieħed kampjun żgħir mill-pinna tad-denb ta' kull ħuta biex jiġi determinat is-sess ġenotipiku tal-individwu (jiġifieri qtugħ tal-pinna) għall-ħut kollu. Din l-informazzjoni tintuża biex jiġu stabbiliti l-pari tat-tgħammir.

Fi żmien tliet ijiem wara li jiġi determinat is-sess ġenotipiku ta' kull ħuta, jiġu stabbiliti b'mod aleatorju 12-il par tat-tgħammir għal kull trattament u 24 par għal kull kontroll. Żewġ ħutiet XX u XY minn kull replika jintgħażlu b'mod aleatorju u mbagħad jiġu raggruppati skont is-sess, u mbagħad jintgħażlu b'mod aleatorju biex jistabbilixxu par tat-tgħammir (jiġifieri par XX-XY). Tal-anqas jiġu stabbiliti 12-il replika għal kull trattament kimiku u tal-anqas 24 replika għall-kontroll b'par tat-tgħammir wieħed għal kull replika. Jekk replika ma jkollhiex żewġ ħutiet XX jew żewġ ħutiet XY disponibbli għar-raggruppament, għandu jinkiseb il-ħut bil-ġenotip tal-ġeneru xieraq minn repliki oħra fi ħdan it-trattament.

Il-ħut li jifdal (massimu ta' tmien ħutiet għal kull replika) jinqatel bl-ewtanażja u jittieħed kampjun tiegħu għad-diversi punti ta' tmiem subadulti. Id-*data* tad-*dmy* (XX jew XY) għall-kampjuni subadulti kollha tinżamm biex jiġi żgurat li d-*data* tal-punti ta' tmiem kollha tkun tista' tiġi relatata mas-sess ġenetiku ta' kull ħuta individwali.

Ġimgħat tat-Test 13-14 (F1)

L-esponiment ikompli hekk kif il-pari ta' tgħammir ta' subadulti jiżviluppaw f'adulti. Fil-Jum 98 tat-Test (jiġifieri l-jum qabel ma jinbeda l-ġbir tal-bajd), il-bajd jitneħħa kemm mill-akkwarji kif ukoll min-nisa.

Ġimgħat tat-Test 15-17 (F1)

Il-bajd riprodott jinġabar ta' kuljum għal 21 jum konsekuttiv f'kull replika, u jiġi vvalutat għall-fekondità u għall-fertilità.

Ġimgħa 18 tat-Test (ripetizzjoni tal-Ġimgħa 4 tat-Test) (F1 u F2)

Fil-Jum 120 tat-Test, il-ġbir tal-bajd isir f'kull tank ta' repliki filgħodu. Il-bajd miġbur jiġi vvalutat u l-bajd fertilizzat (filamenti mneħħija) minn kull wieħed mill-pari tat-tgħammir jiġi raggruppat skont it-trattament, jitqassam b'mod sistematiku fil-kompartimenti ta' inkubazzjoni tal-bajd b'20 bajda fertilizzata għal kull inkubatur. L-inkubaturi jistgħu jitqiegħdu f'tankijiet inkubaturi separati stabbiliti għal kull trattament jew fit-tank ta' repliki li mat-tifqis se jkun fih il-larva mfaqqsa. Idealment l-embrijuni jinġabru f'jum wieħed; madankollu, jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni, l-embrijuni jistgħu jinġabru fuq jumejn. Jekk jinġabru wara jumejn, l-embrijuni kollha fi ħdan it-trattamenti li jkunu nġabru fl-ewwel jum jiġu raggruppati ma' dawk miġbura fit-tieni jum. Imbagħad, l-embrijuni raggruppati totali għal kull trattament jiġu distribwiti b'mod aleatorju f'kull wieħed mill-inkubaturi ta' repliki f'20 embrijun għal kull inkubatur. Nota: Jekk trattament wieħed ikun jeħtieġ it-tieni jum ta' ġbir, it-trattamenti kollha (inklużi l-kontrolli) iridu jsegwu din il-proċedura. Jekk wara t-tieni jum tal-ġbir ikun hemm numri inadegwati ta' embrijuni fi ħdan trattament biex jitgħabbew 20 embrijun għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' embrijuni mgħobbija fi ħdan dak it-trattament speċifiku għal 15-il embrijun għal kull inkubatur. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni biex jitgħabbew 15 għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' inkubaturi ta' repliki sakemm ikun hemm biżżejjed embrijuni għal 15 għal kull inkubatur.

Fil-Jum 121 tat-Test (jew fil-Jum 122 tat-Test, biex tiżgura li l-F2 bdiet sew), il-pari tat-tgħammir tal-F1 jinqatlu bl-ewtanażja u jiġu analizzati għall-punti ta' tmiem tal-adulti. Jekk ikun hemm bżonn, il-pari tat-tgħammir F1 jistgħu jinżammu għal jum/jumejn addizzjonali biex terġa' tinbeda l-F2.

Ġimgħat tat-Test 19-20 (F2)

Jum sa jumejn qabel il-bidu antiċipat tat-tifqis, waqqaf jew naqqas l-aġitazzjoni tal-bajd tal-inkubazzjoni biex tħaffef it-tifqis. Jekk it-test jiġi terminat bit-tlestija tat-tifqis tal-F2, kull jum l-imfaqqsa jingħaddu u jintremew. (L-embrijuni li ma jkunux għadhom faqqsu wara żmien twil ta' inkubazzjoni, definit bħala d-doppju tal-jum medjan tal-kontroll tat-tifqis, jitqiesu mhux vijabbli).

Appendiċi 10

ANALIŻI STATISTIKA

It-tipi ta' *data* bijoloġika ġenerata fl-MEOGRT mhumiex uniċi għalih u ħlief għad-*data* dwar il-patoloġija, ġew żviluppati ħafna metodoloġiji statistiċi xierqa biex tiġi analizzata *data* simili skont il-karatteristiċi tad-*data* inklużi n-normalità, l-omoġenità tal-varjanza, jekk id-disinn tal-istudju jistax jiġi soġġett għall-ittestjar tal-ipoteżi jew għall-analiżi tar-rigressjoni, għal testijiet parametriċi kontra testijiet mhux parametriċi, eċċ. Bħala prinċipju ġenerali, l-analiżijiet statistiċi suġġeriti jsegwu r-rakkomandazzjonijiet tal-OECD għad-*data* dwar l-ekotossiċità (OECD 2006) u fil-Figura 2 hi pprovduta flowchart tad-deċiżjonijiet għall-analiżi tad-*data* tal-MEOGRT.

Hu supponut li spiss, is-settijiet ta' *data* juru risponsi monotoniċi. Barra minn hekk, għandha tiġi kkunsidrata l-kwistjoni ta' użu ta' test statistiku b'denb wieħed kontra test statistiku b'żewġt idnub. Sakemm ma jkunx hemm raġunament bijoloġiku li jagħmel test b'denb wieħed inadatt, hu suġġerit li jintużaw testijiet b'denb wieħed. Filwaqt li t-taqsima li ġejja tirrakkomanda ċerti testijiet statistiċi, jekk jiġu żviluppati metodi statistiċi aktar xierqa u/jew b'saħħithom għall-applikazzjoni għad-*data* speċifika ġenerata fl-MEOGRT, dawk it-testijiet statistiċi jintużaw biex jingranaw dawk il-vantaġġi.

Id-*data* tal-MEOGRT għandha tiġi analizzata b'mod separat għal kull sess ġenotipiku. Hemm żewġ strateġiji biex tiġi analizzata d-*data* mill-ħut b'sess imdawwar (irġiel XX jew nisa XY). 1) Tiċċensura d-*data* kollha minn ħut b'sess imdawwar fit-test kollu ħlief il-prevalenza tat-tidwir tas-sess f'kull replika. 2) Tħalli d-*data* mil-ħut kollu b'sess imdawwar fis-sett ta' *data* u tanalizza fuq il-bażi tal-ġenotip.

Data tal-istopatoloġija

Id-*data* tal-istopatoloġija tiġi rapportata bħala punteġġi tas-severità li jiġu evalwati bl-użu ta' proċedura statistika żviluppata ġdida, Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). L-aġġustament *Rao-Scott* iżomm l-informazzjoni dwar ir-replika tat-test; il-proċedura *by Slices* tinkorpora l-aspettattiva bijoloġika li l-punteġġi tas-severità għandhom tendenza li jiżdiedu aktar ma jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet tat-trattament. Għal kull djanjożi, l-eżitu tal-RSCABS jispeċifika liema trattamenti għandhom prevalenza ogħla tal-patoloġija mill-kontrolli u l-livell ta' severità assoċjat.

Data dwar il-fekondità

L-analiżijiet għad-*data* dwar il-fekondità jikkonsistu f'test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra jew ta' Williams biex jiġu determinati l-effetti tat-trattament, dment li d-*data* tkun konsistenti ma' rispons monotonu għall-konċentrazzjoni. B'test ta' tendenza ta' rigressjoni, kull tqabbil isir fil-livell ta' sinifikat ta' 0,05 u ma jsir ebda aġġustament għan-numru ta' paraguni. Id-*data* hi mistennija tkun konsistenti ma' rispons monotonu għall-konċentrazzjoni, iżda din tista' tiġi verifikata jew bi spezzjoni viżwali tad-*data* jew bil-bini ta' kuntrasti lineari u kwadratiċi tal-medji tat-trattament wara trasformazzjoni tal-ordni tal-klassifikazzjonijiet tad-*data*. Ħlief jekk il-kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u l-kuntrast lineari ma jkunx sinifikanti, isir it-test ta' tendenza. Inkella, jintuża t-test ta' Dunnett biex jiġu determinati l-effetti tat-trattament jekk id-*data* tiġi distribwita b'mod normali b'varjanzi omoġeni. Jekk dawk ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati, jintuża t-test ta' Dunn b'aġġustament ta' Bonferonni-Holm. It-testijiet indikati kollha jsiru b'mod indipendenti minn kwalunkwe test ġenerali F jew ta' Kruskal-Wallis Aktar dettalji huma pprovduti f'OECD 2006.

Jistgħu jintużaw metodi alternattivi, bħal mudell lineari ġeneralizzat b'erruri ta' Poisson għall-għadd tal-bajd (b'ebda transformazzjoni), jekk dawn ikunu statistikament ġustifikati (Cameron u Trividi, 2013). Hu rakkomandat parir statistiku jekk jintuża approċċ alternattiv.

Għadd tal-Bajd ta' Kuljum fi ħdan Ġenerazzjoni Waħda

Il-mudell ANOVA jingħata b'Y=Żmien*Żmien+Trattament + *Trattament + Żmien*Trattament + *Żmien*Trattament, b'effetti aleatorji tar-Replika(Ġenerazzjoni*Trattament), u Żmien*Replika(Trattament), biex ikun jista' jkun hemm komponenti ta' varjanza mhux indaqs taż-żewġ tipi fost il-ġenerazzjonijiet. Hawnhekk Żmien tirreferi għall-frekwenza tal-għadd tal-bajd (eż., Jum jew Ġimgħa). Din hi analiżi b'kejlijiet ripetuti, bil-korrelazzjonijiet bejn l-osservazzjonijiet fl-istess repliki li jirrappreżentaw in-natura ta' kejlijiet ripetuti tad-*data*.

L-effetti ewlenin tat-trattament jiġu ttestjati bl-użu tat-test ta' Dunnett (jew Dunnett-Hsu), li jaġġusta għan-numru ta' paraguni. L-aġġustamenti għall-effett ewlieni tal-ġenerazzjoni jew tal-ħin huma meħtieġa, peress li b'dawn iż-żewġ fatturi, ma hemm ebda livell ta' kontroll u kull par ta' livelli hu paragun ta' interess possibbli. Għal dawn iż-żewġ effetti ewlenin, jekk it-test-F għall-effett ewlieni jkun sinifikanti fil-livell 0,05, il-paraguni bejn il-pari fil-livelli ta' dak il-fattur ikunu jistgħu jiġu ttestjati fil-livell ta' 0,05 mingħajr aġġustament ulterjuri.

Il-mudell jinkludi interazzjonijiet ta' żewġ u ta' tliet fatturi, biex effett ewlieni għal, pereżempju, żmien, ma jkunx jista' jkun sinifikanti, anki jekk iż-żmien ikollu impatt sinifikanti fuq ir-riżultati. B'hekk, jekk interazzjoni ta' żewġ jew ta' tliet fatturi li tinvolvi ż-żmien tkun sinifikanti fil-livell ta' 0,05, wieħed jista' jaċċetta l-paraguni tal-livelli tal-ħin fil-livell ta' sinifikat ta' 0,05 mingħajr aġġustament ulterjuri.

Imbagħad ikun imiss it-testijiet-F għas-sinifikat tat-trattament fi ħdan iż-żmien, l-hekk imsejħa slices fit-tabella ta' ANOVA. Jekk, pereżempju, is-slice għat-trattament fi ħdan F1 u ż-żmien 12, ikun sinifikanti fil-livell ta' 0,05, il-paraguni bejn il-pari għat-trattament fi ħdan F1 u ż-żmien 12 jistgħu jiġu aċċettati fil-livell ta' 0,05 mingħajr aġġustament ulterjuri. Japplikaw dikjarazzjonijiet simili għal testijiet għaż-żmien fi ħdan l-F1 u t-trattament u għall-ġenerazzjoni fi ħdan żmien u trattament.

Finalment, għall-paraguni li ma jaqgħux taħt xi waħda mill-kategoriji msemmija hawn fuq, il-paraguni għandhom ikunu aġġustati bl-użu tal-aġġustamenti ta' Bonferroni-Holm għall-valuri-p. Informazzjoni ulterjuri dwar l-analiżijiet tat-tali mudelli tista' tinstab f'Hocking (1985) u f'Hochberg u Tamhane (1987).

Inkella, id-*data* mhux proċessata tiġi reġistrata u ppreżentata fir-rapport tal-istudju bħala l-fekondità (numru ta' bajd) għal kull replika għal kull jum. Għandha tiġi kkalkolata l-medja tar-repliki tad-*data* mhux proċessata u mbagħad għandha tiġi applikata trasformazzjoni bl-għerq kwadrat. ANOVA f'direzzjoni waħda dwar il-medji tar-repliki trasformati għandha tiġi kkalkolata segwita mill-kuntrasti ta' Dunnett. Jista' jkun siewi wkoll li ssir spezzjoni viżwali tad-*data* dwar il-fekondità ta' kull trattament u/jew replika bi scatterplot li turi d-*data* maż-żmien. Din tippermetti li ssir valutazzjoni informali tal-effetti potenzjali maż-żmien.

Id-*data* bijoloġika l-oħra kollha

L-analiżjiet statistiċi huma bbażati fuq is-suppożizzjoni sottostanti li bl-għażla tad-doża xierqa, id-*data* tkun monotonika. B'hekk, id-*data* tiġi supponuta monotonika u tiġi evalwata b'mod formali għall-monotoniċità bl-użu ta' kuntrasti lineari u kwadratiċi. Jekk id-*data* tkun monotonika, hu rakkomandat li jsir test ta' tendenzi tal-medjani tar-repliki ta' Jonckheere-Terpstra (kif rakkomandat f'OECD 2006). Jekk il-kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u l-kuntrast lineari ma jkunx, id-*data* titqies mhux monotonika.

Jekk id-*data* ma tkunx monotonika, b'mod partikolari minħabba r-rispons imnaqqas tal-ogħla trattament jew tal-ogħla żewġ trattamenti, għandha tingħata kunsiderazzjoni liċ-ċensura tas-sett ta' *data* biex l-analiżi ssir mingħajr dawk it-trattamenti. Din id-deċiżjoni jkollha ssir b'ġudizzju professjonali u bid-*data* disponibbli kollha, speċjalment id-*data* li tindika tossiċità ċara f'dawk il-livelli ta' trattament.

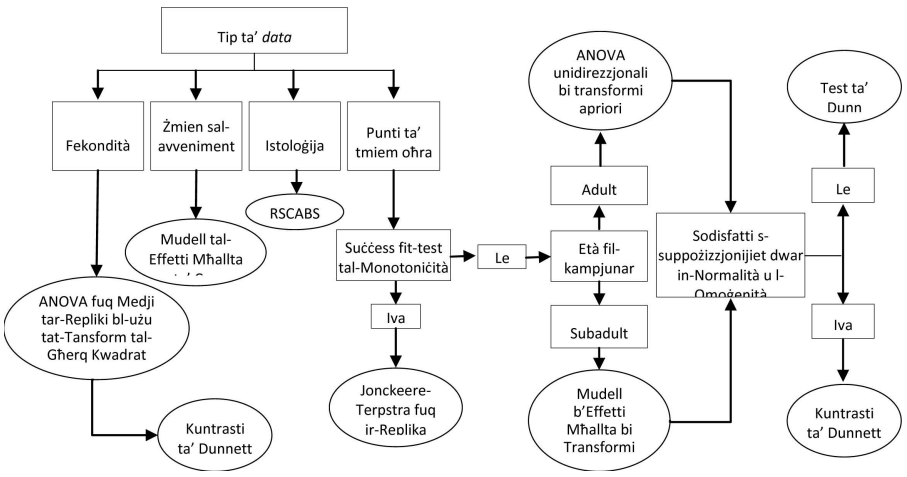
Għall-piż u għat-tul, ma hi rakkomandata ebda trasformazzjoni għalkemm din kultant tista' tkun neċessarja. Madankollu, trasformazzjoni tal-log hi rakkomandata għad-*data* dwar il-vitelloġenina; trasformazzjoni bl-għerq kwadrat hi rakkomandata għad-*data* dwar l-SSC (papilli tal-pinen anali); trasformazzjoni bl-għerq kwadrat arcsine hi rakkomandata għad-*data* dwar it-tifqis ta' proporzjon, għas-sopravivenza perċentwali, għall-proporzjon tas-sess, u għall-perċentwal tal-bajd fertili. Iż-żmien sat-tifqis u ż-żmien sal-ewwel riproduzzjoni għandhom jiġu trattati bħala *data* taż-żmien sa avveniment, bl-embrijuni individwali li ma jfaqqsux fil-perjodu definit jew bir-repliki li qatt ma jirriproduċu li jiġu trattati bħala *data* right-censored. Iż-żmien sat-tifqis għandu jiġi kkalkolat mill-jum medjan tat-tifqis ta' kull replika. Dawn il-punti ta' tmiem għandhom jiġu analizzati bl-użu tal-mudell ta' periklu proporzjonali ta' Cox b'effetti mħallta.

Id-*data* bijoloġika minn kampjuni ta' adulti jkollha kejl wieħed għal kull replika, jiġifieri, jkun hemm ħuta XX waħda u ħuta XY waħda għal kull akkwarju tar-repliki. Għaldaqstant, hu rakkomandat li ssir ANOVA f'riezzjoni waħda fuq il-medji tar-repliki. Jekk jiġu ssodisfati s-suppożizzjonijiet tal-ANOVA (normalità u omoġenità tal-varjanza kif valutati fuq ir-residwi tal-ANOVA bit-test ta' Sapiro-Wilks u bit-test ta' Levene, rispettivament), il-kuntrasti ta' Dunnett għandhom jintużaw biex jiġu determinati trattamenti li kienu differenti mill-kontroll. Min-naħa l-oħra, jekk is-suppożizzjonijiet tal-ANOVA ma jiġux issodisfati, għandu jsir test ta' Dunn biex jiġi determinat liema trattamenti kienu differenti mill-kontroll. Hi rakkomandata proċedura simili għal *data* li tkun fil-forma ta' perċentwali (fertilità, tifqis u sopravivenza).

Id-*data* bijoloġika minn kampjuni ta' subadulti għandha minn kejl sa tmien kejlijiet għal kull replika, jiġifieri, jista' jkun hemm numru varjabbli ta' individwi li jikkontribwixu għall-medja ta' repliki għal kull sess ġenotipiku. Għaldaqstant, hu rakkomandat li jintuża mudell tal-ANOVA b'effetti mħallta segwit minn kuntrasti ta' Dunnett, jekk jiġu ssodisfati s-suppożizzjonijiet dwar in-normalità u l-omoġenità tal-varjanza (fuq ir-residwi tal-ANOVA b'effetti mħallta). Jekk is-suppożizzjonijiet tal-ANOVA ma jiġux issodisfati, għandu jsir test ta' Dunn biex jiġi determinat liema trattamenti kienu differenti mill-kontroll.

Figura 2

Flow chart għall-proċeduri statistiċi rakkomandati għall-analiżi tad-*data* tal-MEOGRT.



DOKUMENTAZZJONI

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC u Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y u Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 **L-ASSAĠĠ TAT-TKABBIR U TAL-IŻVILUPP TAL-ANFIBJI LARVALI (LADGA)**

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 241 (2015) tal-OECD. Il-ħtieġa ta' żvilupp u ta' validazzjoni ta' assaġġ li kapaċi jidentifika u jikkaratterizza l-konsegwenzi avversi tal-esponiment għal sustanzi kimiċi tossiċi fl-anfibji ġejja mit-thassib li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkaġunaw effetti avversi kemm fuq il-bniedem kif ukoll fuq l-organiżmi selvaġġi. Il-linja gwida tat-test tal-OECD tal-Assaġġ tat-Tkabbir u tal-Iżvilupp tal-Anfibji Larvali (LAGDA) tiddeskrivi test tat-tossiċità bi speċi anfibja li jqis it-tkabbir u l-iżvilupp mill-fertilizzazzjoni sal-perjodu bikri meta l-ħut ikun għadu żgħir. Hu assaġġ (tipikament ta' 16-il ġimgħa) li jivvaluta l-iżvilupp bikri, il-metamorfosi, is-sopravivenza, it-tkabbir u l-maturazzjoni riproduttiva parzjali. Jippermetti wkoll il-kejl ta' sensiela ta' punti ta' tmiem oħra li jippermetti li ssir evalwazzjoni djanjostika ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali (EDCs) suspettati jew ta' tipi oħra ta' tossikanti għall-iżvilupp u għar-riproduzzjoni. Il-metodu deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar hu derivat mill-ħidma ta' validazzjoni fuq iż-żrinġ Afrikan bil-qawqba (*Xenopus laevis*) mill-U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) b'ħidma ta' sostenn fil-Ġappun (1). Għalkemm l-ispeċi anfibja tista' tiġi adattata għal protokoll tat-test tat-tkabbir u tal-iżvilupp bil-ħila li jiddetermina s-sess ġenetiku li hi komponent importanti, il-metodi speċifiċi u l-punti ta' tmiem osservazzjonali spjegati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma applikabbli għall-*Xenopus laevis* biss.

2. Il-LAGDA jservi bħala test ta' livell ogħla b'anfibju għall-ġbir ta' informazzjoni aktar komprensiva dwar ir-rispons għall-konċentrazzjoni dwar l-effetti avversi xierqa għall-użu fl-identifikazzjoni u fil-karatterizzazzjoni tal-perikli, u f'valutazzjoni tar-riskju ekoloġiku. L-assaġġ joqgħod fil-Livell 4 tal-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali, fejn l-assaġġi *in vivo* jipprovdi *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti (2). Id-disinn ġenerali tal-esperiment jinvolvi l-esponiment tal-embrijuni ta' *X. laevis* fl-istadju 8-10 ta' Nieuwkoop u Faber (NF) (3) għal minimu ta' erba' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test (ġeneralment imqassma f'intervalli mhux anqas minn nofs logaritmiċi) u kontroll(i) sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 tal-NF fil-kontroll, b'subkampjun interim wieħed fl-istadju 62 tal-NF (≤ 45 wara l-fertilizzazzjoni; normalment madwar 45 jum (dpf). Hemm erba' repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test bi tmien repliki għall-kontroll. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment (fis-subkampjun interim u fil-kampjun finali mat-tlestija tat-test) jinkludu dawk indikattivi ta' tossiċità ġeneralizzata: il-mortalità, l-imġiba anormali, u d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (it-tul u l-piż) kif ukoll il-punti ta' tmiem imfassla biex jikkaratterizzaw modalitajiet ta' azzjoni speċifiċi dwar it-tossiċità endokrinali mmirati lejn il-proċessi fiżjoloġiċi medjati bl-estroġenu, bl-androġenu jew bit-tirojde. Il-metodu jixħet enfasi primarja fuq l-effetti potenzjali rilevanti għall-popolazzjoni (jiġifieri l-impatti avversi fuq is-sopravivenza, l-iżvilupp, it-tkabbir u l-iżvilupp riproduttiv) għall-kalkolu ta' Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) jew Konċentrazzjoni b'Effett li tikkawża tibdil ta' × % (Ecx) fil-punt ta' tmiem imkejjel. Għalkemm ta' min jinnota li l-approċċi tal-ECx rarament ikunu xierqa għal studji kbar ta' dan it-tip fejn iż-żieda tan-numru tal-konċentrazzjonijiet tat-test biex tkun tista' tiġi determinata l-ECx mixtieqa tista' tkun imprattika. Ta' min jinnota li l-metodu ma jkoprix il-fażi riproduttiva nfisha. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Minħabba n-numru limitat ta' sustanzi kimiċi ttestjati u ta' laboratorji involuti fil-validazzjoni ta' dan l-assaġġ kemxejn kumpless, speċjalment minħabba li r-riproduċibbiltà interlaboratorja mhix dokumentata b'*data* sperimentali s'issa, hu antiċipat li la jkun hemm numru suffiċjenti ta' studji disponibbli biex jiġi żgurat l-impatt ta' dan id-disinn il-ġdid tal-istudju, il-linja gwida tat-test 241 tal-OECD se tiġi rieżaminata u, jekk ikun hemm bżonn, riveduta, fid-dawl tal-esperjenza miksuba. Il-LAGDA hu assaġġ importanti biex jiġu indirizzati l-kontributuri importanti għat-tnaqqis fil-popolazzjoni anfibja bl-evalwazzjoni tal-effetti mill-esponiment għal sustanzi kimiċi matul l-istadju larvali sensittiv, fejn l-effetti fuq is-sopravivenza u l-iżvilupp, inkluż l-iżvilupp normali tal-organi riproduttivi, jistgħu jaffettwaw il-popolazzjonijiet b'mod avvers.

4. It-test hu mfassal biex jindividwa effett(i) apiċi li jirriżultaw kemm minn mekkaniżmi endokrinali kif ukoll minn dawk mhux endokrinali, u jinkludi punti ta' tmiem djanjostiċi li huma parzjalment speċifiċi għal modalitajiet endokrinali ewlenin. Ta' min jinnota li sakemm ġie żviluppat il-LAGDA, ma kien jeżisti ebda assaġġ validat li jservi din il-funzjoni għall-anfibji.

5. Qabel ma jinbeda l-assaġġ, importanti li wieħed ikollu informazzjoni dwar il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, b'mod partikolari biex ikunu jistgħu jiġu prodotti soluzzjonijiet kimiċi stabbli. Hu neċessarju wkoll li jkun hemm metodu analitiku sensittiv b'mod adegwat għall-verifika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Fuq durata ta' bejn wieħed u ieħor 16-il ġimgħa, l-assaġġ jeħtieġ numru totali ta' 480 annimal, jiġifieri embrijuni *X. laevis* (jew 640 embrijun, jekk jintuża kontroll b'solvent) biex tiġi żgurata saħħa suffiċjenti tat-test għall-evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem rilevanti għall-popolazzjoni bħat-tkabbir, l-iżvilupp u l-maturazzjoni riproduttiva.

6. Qabel l-użu tal-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar regolatorju ta' taħlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk hux se jipprovdi riżultati aċċettabbli għall-iskop regolatorju maħsub. Barra minn hekk, dan l-assaġġ ma jevalwax il-fekondità direttament, u allura jaf ma jkun applikabbli għall-użu fi stadju aktar avvanzat mil-Livell 4 tal-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali.

BAŻI XJENTIFIKA GĦALL-METODU TA' TTESTJAR

7. Ħafna mill-fehim kurrenti tagħha dwar il-bijoloġija anfibja nkiseb bl-użu tal-ispeċi mudell tal-laboratorju *X. laevis*. Din l-ispeċi tista' tiġi kolturata bħala rutina fil-laboratorju, l-ovulazzjoni tista' tiġi indotta bl-użu ta' gonadotropina korjonika umana (hCG) u l-istokkijiet tal-annimali huma disponibbli minnufih mingħand nissiela kummerċjali.

8. Bħall-vertebrati kollha, ir-riproduzzjoni fl-anfibji hi taħt il-kontroll tal-assi ipotalamiku pitwitarju gonadali (HPG) (4). L-estroġeni u l-androġeni huma medjaturi ta' din is-sistema endokrinali, u jidderieġu l-iżvilupp u l-fiżjoloġija ta' tessuti sesswalment dimorfiċi. Hemm tliet fażijiet distinti fiċ-ċiklu tal-ħajja tal-anfibji meta dan l-ass ikun partikolarment attiv: (1) differenzazzjoni gonadali matul l-iżvilupp tal-larva, (2) l-iżvilupp ta' karatteristiċi sesswali sekondarji u maturazzjoni gonadali matul il-fażi li fiha l-anfibji jkunu għandhom qed jikbru u (3) ir-riproduzzjoni funzjonali tal-adulti. Kull waħda minn dawn it-tliet twieqi tal-iżvilupp aktarx li tkun suxxettibbli għal perturbazzjoni endokrinali minn ċerti sustanzi kimiċi bħal estroġeni u androġeni, u finalment twassal għal telfien tal-idoneità riproduttiva mill-organiżmi.

9. Il-gonadi jibdew bl-iżvilupp fl-istadju 43 tal-NF, meta jiżviluppa x-xifer ġentali bipotenzjali għall-ewwel darba. Id-differenzazzjoni tal-gonadi tibda fl-istadju 52 tal-NF meta ċ-ċelloli ġerminali primordjali jimigraw fit-tessut medullari (irġiel) jew jibqgħu fir-reġjun kortikali (nisa) tal-gonadi tal-iżvilupp (3). Dan il-proċess ta' differenzazzjoni sesswali tal-gonadi ġie rrapportat għall-ewwel darba bħala suxxettibbli għal alterazzjoi kimika f'*Xenopus* fil-ħamsinijiet (5) (6). L-esponiment tal-imrieżeb għall-estradjol matul dan il-perjodu ta' differenzazzjoni gonadali jirriżulta f'tibdil tas-sess tal-irġiel li, meta jsiru adulti, isiru nisa kompletament funzjonali (7) (8). It-tibdil tas-sess funzjonali tan-nisa f'irġiel hu possibbli wkoll u ġie rapportat wara l-impjantazzjoni tat-tessut tat-testikoli fl-imrieżeb (9). Madankollu, għalkemm

l-esponiment għal inibitur tal-aromataži jikkawża tidwir tas-sess funzjonali wkoll f'*X. tropicalis* (10), dan ma ntweriex li jseħħ f'*X. laevis*. Storikament, l-effetti tossiċi fuq id-differenzazzjoni gonadali ġew ivvalutati b'eżami istoloġiku tal-gonadi fil-metamorfosi u t-tibdil tas-sess seta' jiġi determinat b'analiżi tal-proporzjonijiet tas-sess biss. Sa ftit tażżmien ilu, ma kien hemm ebda mezz biex jiġi determinat b'mod dirett is-sess ġenetiku ta' *Xenopus*. Madankollu, stabbiliment riċenti ta' markaturi marbuta mas-sess f'*X. laevis* jagħmilha possibbli li jiġi determinat is-sess ġenetiku u jippermetti għall-identifikazzjoni diretta ta' annimali li jbiddlu s-sess (11).

10. Fl-irġiel, l-iżvilupp tal-ħut li jkun għadu qed jikber jipproċedi hekk kif il-livelli ta' testosteron fid-demm jiżdiedu b'mod korrispondenti għall-iżvilupp ta' karatteristiċi sesswali sekondarji kif ukoll għall-iżvilupp tat-testikoli. Fin-nisa, l-estradjol jiġi prodott mill-ovarji u jirriżulta fid-dehra tal-vitelloġenina (VTG) fil-plażma, f'ooċiti vitelloġeniċi fl-ovarju u fl-iżvilupp ta' ovidotti (12). L-ovidotti huma karatteristiċi sesswali sekondarji tan-nisa li jiffunzjonaw fil-maturazzjoni tal-ooċiti matul ir-riproduzzjoni. Il-kisjiet tal-ġelì jiġu applikati man-naħa ta' barra tal-ooċiti hekk kif jgħaddu mill-ovidott u jingħabru fil-borża tal-ovarju, lesti għall-fertilizzazzjoni. L-iżvilupp tal-ovidotti jidher li hu regolat mill-estroġeni hekk kif l-iżvilupp jikkorrelata mal-livelli ta' estradjol fid-demm f'*X. laevis* (13) u f'*X. tropicalis* (12). Ġie rrapportat l-iżvilupp ta' ovidotti fl-irġiel wara l-esponiment għal komposti tal-poliklorobifenili (14) u għal 4-*terz*-ottilfenol (15).

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Id-disinn tat-test jinvolvi l-esponiment tal-embrijuni ta' *X. laevis* fl-istadju 8-10 tal-NF permezz tar-rotta mal-ilma għal erba' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll għall-kontroll(i) sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 tal-NF fil-kontroll, b'subkampjun interim wieħed fl-istadju 62 tal-NF. Filwaqt li jista' jkun possibbli wkoll li sustanzi kimiċi ferm idrofobiċi jingħataw mal-għalf, s'issa ftit li xejn kien hemm esperjenza bl-użu ta' din ir-rotta ta' esponiment f'dan l-assaġġ. Hemm erba' repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test bi tmien repliki għal kull kontroll użat. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment jinkludu dawk li jindikaw tossiċità ġeneralizzata (jiġifieri l-mortalità, l-imġiba anormali u d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (tul u piż)), kif ukoll il-punti ta' tmiem imfassla biex jikkaratterizzaw modalitajiet ta' azzjoni speċifiċi tat-tossiċità endokrinali mmirati lejn proċessi fiżjoloġiċi medjati bl-estroġenu, bl-androġenu jew bit-tirojde (jiġifieri istopatoloġija tat-tirojde, istopatoloġija tal-gonadi u tal-kanal tal-gonadi, żvilupp anormali, vitelloġenina tal-plażma (fakultattiva), u proporzjonijiet tas-sess ġenotipiku/fenotipiku).

KRITERJI TA' VALIDITÀ TAT-TEST

12. Japplikaw il-kriterji li ġejjin għall-validità tat-test:

— Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun ≥ 40 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja matul it-test;

— It-temperatura tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 21 ± 1 °C u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbżu l-1,0 °C;

— Il-pH tas-soluzzjoni tat-test għandha tinżamm bejn 6,5 u 8,5, u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhiex taqbeż iż-0,5;

— Għandha tkun disponibbli evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla;

— Il-mortalità tul il-perjodu ta' esponiment għandha tkun ta' < 20 % f'kull replika fil-kontrolli;

— vijabbiltà ta' ≥ 70 % fis-suġġetti riprodotti magħżula biex jinbeda l-istudju;

— Iż-żmien medjan għall-istadju 62 tal-NF tal-kontrolli għandu jkun ta' ≤ 45 jum.

— Il-piż medju tal-organiżmi tat-test fl-istadju 62 tal-NF u fit-terminazzjoni tal-assaġġ fil-kontrolli u fil-kontrolli b'solvent (jekk użati) għandu jilħaq il-1,0 ± 0,2 u 11,5 ± 3 g, rispettivament.

13. Filwaqt li mhuwiex kriterju ta' validità, hu rakkomandat li jkun hemm disponibbli għall-analiżi tal-anqas tliet livelli ta' trattament bi tliet repliki mhux kompromessi. Mortalità eċċessiva, li tikkompromietti trattament, hi definita bħala > 4 mortalitajiet (> 20 %) f'2 repliki jew aktar li ma jistgħux jiġu spjegati minn errur tekniku. Tal-anqas tliet livelli ta' trattament mingħajr tossiċità ċara ovvja għandhom ikunu disponibbli għall-analiżi. Sinjali ta' tossiċità ċara jistgħu jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, żamma fil-wiċċ, tluq fil-qiegħ tat-tank, għawm invertit jew irregolari, nuqqas ta' attività ta' tlugħ fil-wiċċ, u nuqqas ta' rispons għal stimoli, anormalitajiet morfoloġiċi (*eż.* deformitajiet fl-estremitajiet), leżjonijiet emorraġiċi, u edema addominali.

14. F'każ ta' devjazzjoni mill-kriterji ta' validità tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tar-riżultati tat-test u dawn id-devjazzjonijiet u l-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapport tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODI

Apparat

15. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

(a) apparat għall-kontroll tat-temperatura (eż., ħiters jew berrieda aġġustabli sa 21 ± 1 °C);

(b) termometru;

(c) mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari u għodod tad-dissezzjoni;

(d) kamera diġitali b'riżoluzzjoni minima ta' 4 megapixels u b'mikrofunzjoni (jekk meħtieġa);

(e) miżien analitiku li kapaċi jkejjel sa 0,001 mg jew 1 µg;

(f) apparat li jkejjel l-ossiġenu dissolt u apparat li jkejjel il-pH;

(g) apparat li jkejjel l-intensità tad-dawl li kapaċi jkejjel f'unitajiet lux;

L-ilma

Sors u kwalità

16. Jista' jintuża kwalukwe ilma ta' dilwizzjoni li jkun disponibbli lokalment (eż. ilma tan-nixxiegħa jew ilma tal-vit iffiltrat bil-faħam) u jippermetti tkabbir u żvilupp normali ta' *X. laevis*, u għandha tkun disponibbli evidenza ta' tkabbir normali f'dan l-ilma. Peress li l-kwalità tal-ilma lokali tista' tvarja b'mod sostanzjali bejn żona u oħra, għandha tiġi analizzata l-kwalità tal-ilma, b'mod partikolari jekk ma jkunx hemm disponibbli *data* storika dwar l-użu tal-ilma għat-trobbija tal-larva tal-anfibji. Il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO_4{}^{2-}$), il-pestiċidi, il-karbonju organiku totali u s-solidi sospiżi għandu jsir qabel ma jibda l-ittestjar u/jew, pereżempju, kull sitt xhur meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li jkun relattivament kostanti fil-kwalità. Ċerti karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2.

Konċentrazzjoni ta' jodur fl-ilma tat-test

17. Biex il-glandola tat-tirojde tissintetizza l-ormoni tat-tirojde biex issostni l-metamorfosi normali, irid jitqiegħed għad-dispożizzjoni biżżejjed jodur għal-larva permezz ta' taħlita ta' sorsi milwiema u djetetiċi. Bħalissa, ma hemm ebda linja gwida derivata empirikament għall-konċentrazzjonijiet minimi tal-jodur fl-ikel jew fl-ilma biex jiġi żgurat żvilupp xieraq. Madankollu, id-disponibbiltà tal-jodur tista' taffettwa r-risponsività tas-sistema tat-tirojde għal aġenti attivi fit-tirojde u hi magħrufa li timmodula l-attività tal-bażi tal-glandola tat-tirojde, u jistħoqqilha attenzjoni meta jiġu interpretati r-riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde. Fuq il-bażi tal-ħidma preċedenti, intwera li l-assaġġ irnexxa meta l-konċentrazzjonijiet tal-jodur (I^{-}) fl-ilma ta' dilwizzjoni jvarjaw bejn 0,5 u 10 µg/l. Idealment, il-konċentrazzjoni minima tal-jodur fl-ilma ta' dilwizzjoni matul it-test għandha tkun ta' 0,5 µg/l (miżjud bħala melħ tas-sodju jew tal-potassju). Jekk l-ilma tat-test jiġi rikostitwit minn ilma dejonizzat, il-jodju għandu jiżdied b'konċentrazzjoni minima ta' 0,5 µg/l. Il-konċentrazzjonijiet imkejla tal-jodur mill-ilma tat-test (jiġifieri l-ilma ta' dilwizzjoni) u s-supplimentazzjoni tal-ilma tat-test ma' jodju jew ma' mluħ oħra (jekk jintużaw) għandhom jiġu rapportati. Il-kontenut ta' jodju jista' jitkejjel fl-ikel ukoll minbarra fl-ilma tat-test.

Sistema ta' esponiment

18. It-test ġie żviluppat bl-użu ta' sistema dilwitur bi fluss kontinwu. Il-komponenti tas-sistema għandu jkollhom komponenti li jmissu mal-ilma tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli u/jew ta' materjali kimikament inerti oħra. It-tankijiet ta' esponiment għandhom ikunu akkwarji tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli u l-volum utilizzabbli tat-tank għandu jkun bejn 4,0 u 10,0 l (fond minimu tal-ilma ta' 10 sa 15-il cm). Is-sistema għandha tkun tiflaħ għall-konċentrazzjonijiet tal-esponiment kollha, għal kontroll, u għal kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn, b'erba' repliki għal kull trattament u tmienja fil-kontrolli. Ir-rata tal-fluss għal kull tank għandha tkun kostanti wara li jingħata kont kemm liż-żamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll lill-esponiment kimiku. Hu rakkomandat li r-rati tal-fluss għandhom ikunu xierqa (*eż.* tal-anqas 5 tibdiliet tat-tank kuljum) biex jiġi evitat tnaqqis fil-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika minħabba metaboliżmu kemm mill-organiżmi tat-test kif ukoll mill-mikroorganiżmi akwatiċi fl-akkwarji jew fir-rotot abijotiċi ta' degradazzjoni (idroliżi, fotoliżi) jew dissipazzjoni (volatilizzazzjoni, sorbiment). It-tankijiet tat-trattament għandhom jiġu assenjati għal għarrieda għal pożizzjoni fis-sistema ta' esponiment biex jitnaqqsu l-effetti pożizzjonali potenzjali, inklużi ċaqliqiet żgħar fit-temperatura, l-intensità tad-dawl, *eċċ.* Aktar informazzjoni dwar kif jiġu stabbiliti sistemi ta' esponiment bi fluss kontinwu tista' tinkiseb mill-Gwida Standard tal-ASTM għat-Twettiq ta' Testijiet tat-Tossiċità Akuta fuq Materjali tat-Test b'Ħut, b'Makroinvertebrati, u b'Anfibji (16).

Twassil tas-sustanza kimika: tħejjija tas-soluzzjonijiet tat-test

19. Biex isiru s-soluzzjonijiet tat-test fis-sistema ta' esponiment, is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi dożata fis-sistema ta' esponiment b'pompa xierqa jew b'apparat ieħor. Ir-rata ta' fluss tas-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi kalibrata skont konferma analitika tas-soluzzjonijiet tat-test qabel it-tnedija tal-esponiment, u tiġi verifikata volumetrikament kull ċertu żmien matul it-test. Il-volum tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment għandu jiġġedded tal-anqas ħames darbiet kull jum.

20. Il-metodu użat biex is-sustanza kimika tat-test tiddaħħal fis-sistema jista' jvarja skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħha. Għaldaqstant, qabel it-test għandha tinkiseb informazzjoni bażi dwar is-sustanza kimika li tkun rilevanti għad-determinazzjoni tat-testabbiltà tagħha. Informazzjoni utli dwar il-proprjetajiet speċifiċi għas-sustanza kimika tat-test tinkludi l-formula strutturali, il-piż molekulari, il-purità, l-istabbiltà fl-ilma u fid-dawl, il-pK_a u l-K_{ow}, is-solubbiltà fl-ilma (idealment fil-medium tat-test) u l-pressjoni tal-fwar kif ukoll ir-riżultati ta' test għal bijodegradabbiltà immedjata (metodu ta' ttestjar C.4 (17) jew C.29 (18)). Is-solubbiltà u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jikkalkolaw il-kostant tal-liġi ta' Henry, li se jindika jekk it-telf minħabba l-evaporazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jistax iseħħ. It-twettiq ta' dan it-test mingħajr l-informazzjoni elenkata hawn fuq għandu jiġi kkunsidrat bir-reqqa peress li d-disinn tal-istudju se jkun jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test u, mingħajr dawn ir-riżultati tat-test għad-*data* jaf ikun diffiċli li jiġi interpretat jew ikun insinifikanti. Għandu jkun hemm metodu analitiku affidabbli disponibbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjonijiet tat-test, b'akkuratezza magħrufa u rapportata kif ukoll b'limitu ta' detezzjoni. Sustanzi kimiċi tat-test solubbli fl-ilma jistgħu jiġu dissolti f'alikwoti tal-ilma ta' dilwizzjoni f'konċentrazzjoni li tippermetti t-twassil bil-konċentrazzjoni tat-test fil-mira f'sistema bi fluss kontinwu. Sustanzi kimiċi li huma likwidi jew solidi f'temperatura ambjentali u moderatament solubbli fl-ilma jistgħu jkunu jeħtieġu saturaturi likwidu:likwidu jew likwidu:solidu (*eż.* kolonna tas-suf tal-ħġieġ) (19). Filwaqt li jista' jkun possibbli wkoll li sustanzi kimiċi tat-test idrofobiċi ħafna jingħataw mal-għalf, ftit li xejn kien hemm esperjenza bl-użu ta' dik ir-rotta ta' esponiment f'dan l-assaġġ.

21. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jitħejjew billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija preferibbilment għandha titħejja billi sempliċiment titħallat jew titħawwad is-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni b'mezzi mekkaniċi (eż. bit-tħawwid jew bl-ultrasonikazzjoni). Jistgħu jintużaw kolonni/sistemi ta' saturazzjoni jew metodi ta' dożaġġ passiv (20) biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Il-preferenza hi li tintuża sistema tat-test ħielsa minn kosolvent; madankollu, sustanzi kimiċi tat-test differenti ser ikollhom proprjetajiet fiżikokimiċi varji li aktarx li jkunu jeħtieġu approċċi differenti għat-tħejjija tal-ilma tal-esponiment tas-sustanza kimika. Għandu jittieħed kull sforz biex jiġu evitati solventi jew trasportaturi għaliex: (1) ċerti solventi nfushom jistgħu jirriżultaw f'tossiċità u/jew f'risponsi mhux mixtieqa jew mhux mistennija, (2) l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi f'livell ogħla mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom (hekk kif spiss jista' jseħħ bl-użu tas-solventi) jista' jirriżulta f'determinazzjonijiet impreċiżi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, (3) l-użu ta' solventi f'testijiet aktar fit-tul jista' jirriżulta fi grad sinifikanti ta' "biofilming" assoċjata ma' attività mikrobika li tista' tħalli impatt fuq il-kundizzjonijiet ambjentali kif ukoll fuq il-ħila li jinżammu l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment u (4) l-assenza ta' *data* storika li turi li s-solvent ma jinfluwenzax l-eżitu tal-istudju, l-użu ta' solventi jeħtieġ trattament ta' kontroll b'solvent li għandu implikazzjonijiet sinifikanti fuq il-benessri tal-annimali peress li jkunu meħtieġa annimali addizzjonali biex isir it-test. Għal sustanzi kimiċi li diffiċli tittestjahom, solvent jista' jintuża bħala l-aħħar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akkwatika ta' Sustanzi u ta' Taħlitiet Diffiċli (21) biex jiġi determinat l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent se tiġi determinata mill-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test u mid-disponibbiltà ta' *data* storika tal-kontroll dwar is-solvent. Fin-nuqqas ta' *data* storika, l-adegwatezza ta' solvent għandha tiġi determinata qabel ma jsir l-istudju definittiv. F'każ li l-użu ta' solvent ma jkunx evitabbli, u sseħħ attività mikrobika (biofilming), hu rakkomandat li jinżamm rekord/li jiġi rapportat dwar il-biofilming għal kull tank (tal-anqas kull ġimgħa) matul it-test sħiħ. Idealment, il-konċentrazzjoni tas-solvent għandha tinżamm kostanti fil-kontroll b'solvent u fit-trattamenti kollha tat-test. Jekk il-konċentrazzjoni tas-solvent ma tinżammx kostanti, għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni tas-solvent fit-trattament tat-test fil-kontroll b'solvent. F'każijiet li fihom jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet massimi tas-solvent ma għandhomx jaqbżu l-100 µl/l jew il-100 mg/l (21), u hu rakkomandat li l-konċentrazzjoni b'solvent tinżamm għall-anqas livell possibbli (*eż.* $\leq$ 20 µl/l) biex jiġu evitati effetti potenzjali tas-solvent fuq il-punti ta' tmiem imkejla (22).

L-annimali tat-test

Speċijiet tat-test

22. L-ispeċi tat-test hi *X. laevis* għaliex din: (1) tiġi kolturata bħala rutina f'laboratorji madwar id-dinja, (2) tinkiseb faċilment mingħand fornituri kummerċjali u (3) is-sess ġenetiku tagħha jista' jiġi determinat.

Tgħammir u indukrar tal-adulti

23. Kura u tgħammir xierqa ta' *X. laevis* huma deskritti minn linja gwida standardizzata (23). L-abitazzjoni u l-kura ta' *X. laevis* huma deskritti wkoll minn Read (24). Biex jiġi pprovokat it-tgħammir, tlieta sa ħames pari nisa u rġiel adulti jiġu injettati b'mod intraperitoneali b'gonadotropina korjonika umana (hCG). Eżemplari nisa u rġiel jiġu injettati b'eż., bejn wieħed u ieħor 800-1000 IU u 500-800 IU, rispettivament, ta' hCG dissolta f'0,6-0,9 % soluzzjoni salina

(jew
is-soluzzjoni taż-żrinġijiet ta' Ringer, salina isotonika għall-użu bl-anfibji). Il-volumi tal-injezzjoni għandhom ikunu madwar µl/g piż tal-ġisem (~1 000 µl). Wara, il-pari għat-tgħammir jinżammu f'tankijiet kbar, mhux disturbati u f'kundizzjonijiet statiċi biex tiġi promossa l-amplessi. Il-qiegħ ta' kull tank tat-tgħammir għandu jkollu qiegħ falz ta' xibka tal-azzar inossidabbli (eż. fetħiet ta' 1,25 cm) li tippermetti biex il-bajd jaqa' f'qiegħ it-tank. Iż-żrinġijiet injettati b'hCG aktar tard waranofsinhar normalment jiddepożitaw ħafna mill-bajd tagħhom sa nofs l-għodwa tal-għada. Wara li tinħeles u tiġi fertilizzata kwantità suffiċjenti ta' bajd, l-adulti għandhom jitneħħew mit-tankijiet tat-tgħammir. Imbagħad il-bajd jinġabar u r-riti tal-ġelì jitneħħew bi trattament taċ-ċisteina-L (23). Għandha titħejja soluzzjoni ta' 2 % ċisteina-L u l-pH għandha tiġi aġġustata għal 8,1 b'1 M NaOH. Din is-soluzzjoni ta' 21 °C tiżdied ma' flask Erlenmeyer ta' 500 ml li jkun fih il-bajd minn riproduzzjoni waħda u titħawwad ġentilment għal minuta jew żewġ minuti u mbagħad titlaħlaħ sew 6-8 darbiet b'ilma tal-koltura ta' 21 °C. Imbagħad il-bajd jiġi trasferit f'dixx kristallizzanti u jiġi determinat li jkun > 70 % vijabbli b'anormalitajiet minimi f'embrijuni li jesibixxu diviżjoni taċ-ċelloli.

DISINN TAT-TEST

Konċentrazzjonijiet tat-test

24. Hu rakkomandat li tal-anqas jintużaw erba' konċentrazzjonijiet kimiċi u kontrolli xierqa (inklużi kontrolli b'solvent, jekk ikun hemm bżonn). Ġeneralment tkun rakkomandata separazzjoni tal-konċentrazzjoni (fattur ta' spazjar) li ma taqbiżx it-3,2.

25. Għall-finijiet ta' dan it-test, ir-riżultati mill-istudji eżistenti fuq l-anfibji għandhom jintużaw sa fejn possibbli fid-determinazzjoni tal-ogħla konċentrazzjoni tat-test biex jiġu evitati konċentrazzjonijiet li jkunu tossiċi wisq. Informazzjoni minn, pereżempju, relazzjonijiet kwantitattivi bejn l-istruttura u l-attività, read across u *data* minn studji eżistenti fuq l-anfibji bħall-Assaġġ ta' Metamorfosi tal-Anfibji, il-metodu ta' ttestjar C.38 (25) u l-Assaġġ tat-Teratoġenesi tal-Embrijuni taż-Żrinġijiet - *Xenopus* (23) u/jew testijiet fuq ħut bħall-metodi ta' ttestjar C.48, C.41 u C.49 (26) (27) (28) jistgħu jikkontribwixxu għall-issettjar ta' din il-konċentrazzjoni. Qabel ma jsir il-LAGDA jista' jsir esperiment ta' sejbien tal-medda. Hu rakkomandat li l-esponiment tas-sejbien tal-medda tinbeda fi ħdan 24 siegħa mill-fertilizzazzjoni u tkompli għal 7-14-il jum (jew aktar, jekk ikun hemm bżonn) u l-konċentrazzjonijiet tat-test jiġu ssettjati b'tali mod li l-intervalli bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test ma jkunux akbar minn fattur ta' 10. Ir-riżultati tal-esperiment ta' sejbien tal-medda għandhom iservu biex tiġi ssettjata l-ogħla konċentrazzjoni tat-test fil-LAGDA. Kun af li jekk ikun intuża solvent, l-adegwatezza tas-solvent (jiġifieri jekk ikollux impatt fuq l-eżitu tal-istudju) tista' tiġi determinata bħala parti mill-istudju ta' sejbien tal-medda.

Repliki fi ħdan gruppi ta' trattament u kontrolli

26. Għandhom jintużaw minimu ta' erba' tankijiet ta' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test u minimu ta' tmien repliki għall-kontrolli (u l-kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn) (jiġifieri n-numru ta' repliki fil-kontroll u fi kwalunkwe kontroll b'solvent għandu jkun id-doppju tan-numru ta' repliki ta' kull grupp tat-trattament, biex tiġi żgurata saħħa statistika xierqa). Kull replika ma għandux ikun fiha aktar minn 20 annimal. In-numru minimu ta' annimali proċessati jkun ta' 15 (5 għas-subkampjun tal-istadju 62tal-NF u 10 ħutiet li għadhom qed jikbru). Madankollu, annimali addizzjonali jiżdiedu f'kull replika biex titqies il-possibbiltà ta' mortalità filwaqt li jinżamm in-numru kritiku ta' 15.

PROĊEDURA

Ħarsa ġenerali lejn l-assaġġ

27. L-assaġġ jitnieda b'embrijuni riprodotti ġodda (sadju 8-10 ta' NF) u jkompli tul l-iżvilupp tal-ħut li jkun għadu qed jikber. L-annimali jiġu eżaminati ta' kuljum għall-mortalità u għal kwalunkwe sinjal ta' mġiba anormali. Fl-istadju 62 ta' NF, jinġabar subkampjun ta' larva (sa ħames annimali għal kull replika) u jiġu eżaminati diversi punti ta' tmiem (Tabella 1). Wara li l-annimali jkollha jkunu laħqu l-istadju 66 ta' NF, jiġifieri t-tlestija tal-metamorfosi (jew wara 70 jum mit-tnedija tal-assaġġ, skont liem jiġi l-ewwel), isir qtil aleatorju (iżda mingħajr subkampjunar) biex in-numru ta' annimali jitnaqqas (10 għal kull tank) (ara l-paragrafu 43), u l-annimali li jifdal jkomplu bl-esponiment sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontroll. Fit-terminazzjoni tat-test (kampjunar tal-ħut li jkun għadu qed jikber) isiru kejlijiet addizzjonali (Tabella 1).

Kundizzjonijiet ta' esponiment

28. Sommarju sħiħ tal-parametri tat-test jista' jinstab fl-Appendiċi 3. Matul il-perjodu ta' esponiment, l-ossiġenu dissolt, it-temperatura, u l-pH tas-soluzzjonijiet tat-test għandhom jitkejlu ta' kuljum. Il-konduttività, l-alkalinità, u l-ebusija jitkejlu darba fix-xahar. Għat-temperatura tal-ilma tas-soluzzjonijiet tat-test, id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti (fi ħdan jum) ma għandhomx jaqbżu l-1,0 °C. Barra minn hekk, għall-pH tas-soluzzjonijiet tat-test, id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhiex taqbeż iż-0,5.

29. It-tankijiet ta' esponiment jistgħu jinġibdu b'sifun fuq bażi ta' kuljum biex jitneħħew ikel mhux mikul u prodotti tal-iskart, b'attenzjoni biex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata tat-tankijiet. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu mminimizzati l-istress u t-trawma għall-annimali, speċjalment matul iċ-ċaqliq, it-tindif tal-akkwarji, u l-manipolazzjoni. Kundizzjonijiet/attivitajiet ta' stress għandhom jiġu evitati bħal storbju qawwi u/jew bla heda, taptip fuq l-akkwarji, theżżiżiet fit-tank.

Id-durata tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test

30. L-esponiment jitnieda b'embrijuni riprodotti ġodda (stadju 8-10 ta' NF) u jitkompla sa għaxar ġimgħat wara ż-żmien medjan għall-istadju 62 ta' NF (≤ 45 jum mit-tnedija tal-assaġġ) fil-grupp tal-kontroll. Ġeneralment, id-durata tal-LAGDA hi ta' 16-il ġimgħa (massimu ta' 17-il ġimgħa).

Tnedija tal-assaġġ

31. Għandu jkun intwera minn qabel li l-annimali ġenituri użati għall-assaġġ jipproduċu wlied li jistgħu jitqassmu skont is-sess ġenetiku (Appendiċi 5). Wara r-riproduzzjoni bejn l-adulti, l-embrijuni jinġabru, u jiġu trattati b'ċisteina biex titneħħa r-rita tal-ġelì u jiġu skrinjati għall-vijabbiltà (23). It-trattament biċ-ċisteina jippermetti li l-embrijuni jiġu mmaniġġjati matul l-iskrinjar mingħajr ma jeħlu mas-superfiċji. L-iskrinjar iseħħ taħt mikroskopju tad-dissezzjoni bl-użu ta' kontagoċċi tal-għajnejn ta' daqs xieraq biex jitneħħew embrijuni mhux vijabbli. Idealment għat-test tintuża riproduzzjoni waħda li tirriżulta f'vijabbiltà ta' aktar minn 70 %. Embrijuni fl-istadju 8-10 ta' NF jitqassmu b'mod aleatorju f'tankijiet tat-trattament bl-esponiment li jkun fihom volum xieraq ta' ilma ta' dilwizzjoni sakemm kull tank ikun fih 20 embrijun. L-embrijuni għandhom jiġu mmaniġġjati b'attenzjoni matul dan it-trasferiment biex jitnaqqas kemm jista' jkun l-istress marbut mal-immaniġġjar u jiġi evitat milli jweġġgħu. 96 siegħa wara l-fertilizzazzjoni, l-imrieżeb għandhom ikunu telgħu fil-kolonna tal-ilma u bdew jaqbdu mal-ġnub tat-tank.

Reġim tal-għalf

32. L-għalf u r-rata tal-għalf jinbidlu matul l-istadji differenti tal-ħajja ta' *X. laevis* u huma aspett importanti ħafna tal-protokoll tal-LAGDA. Tagħlif eċċessiv matul il-faži tal-larva tipikament jirriżulta f'inċidenzi akbar u f'severità akbar tal-iskoljożi (l-Appendiċi 8) u għandu jiġi evitat. Għall-kuntrarju, tagħlif inadegwat matul il-faži tal-larva jirriżulta f'rati ta' żvilupp varjabbli ħafna fost il-kontrolli li potenzjalment jikkomprometti s-saħħa statistika jew iħawwad ir-riżultati tat-test. L-Appendiċi 4 jipprovdi dieta għal-larva u għall-ħut li jkun għadu qed jikber u reġimi tat-tagħlif rakkomandati għal *X. laevis* f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu, iżda alternattivi huma permissibbli dment li l-organiżmi tat-test jikbru u jiżviluppaw b'mod sodisfaċenti. Importanti li jiġi nnotat li jekk ikunu qed jitkejlu l-punti ta' tmiem speċifiċi għall-endokrina, l-għalf għandu jkun ħieles minn sustanzi attivi fl-endokrina bħall-grixa tas-sojja.

Tagħlif tal-larva

33. Id-dieta rakkomandata tal-larva tikkonsisti f'tagħlif tal-bidu għat-troti, f'diski tal-alga *Spirulina* u fi krisps tal-ħut aħmar (*eż.* TetraFin® flakes, Tetra, il-Ġermanja) imħallta flimkien f'ilma tal-koltura (jew tad-dilwizzjoni). Din it-taħlita tingħata tliet darbiet kuljum matul il-ġimgħa u darba kuljum fi tmiem il-ġimgħa. L-imrieżeb jitgħalfu wkoll gamblu tal-ilma mielaħ, *Artemia* spp., nauplii li jkollhom 24 siegħa, darbtejn kuljum matul il-ġimgħa u darba kuljum fi tmiem il-ġimgħa bl-ewwel jum li jaħbat il-jum 8 ta' wara l-fertilizzazzjoni. It-tagħlif tal-larva, li għandu jkun konsistenti f'kull reċipjent tat-test, għandu jippermetti tkabbir u żvilupp xierqa għall-annimali tat-test biex jiġu żgurati riproduċibbiltà u trasferibbiltà tar-riżultati tal-assaġġ: (1) iż-żmien medjan għall-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli għandu jkun ≤ 45 jum u hu rakkomandat (2) piż medju fi ħdan 1,0 ± 0,2 g fl-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli.

Tagħlif taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru

34. Ladarba titlesta l-metamorfosi, ir-reġim tat-tagħlif jikkonsisti f'ikel taż-żrinġijiet premium sinking, eż., Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, l-Istati Uniti) (Appendiċi 4). Għaż-żgħar taż-żrinġijiet (ħut fi stadju bikri li jkun għadu qed jikber), il-gerbub jingħadda għal ħin qsair f'miħan tal-kafè, fi blender jew jitkisser b'mehrież u b'lida biex jitnaqqas id-daqs tagħhom. Ladarba l-ħut li jkun għadu qed jikber isir kbir biżżejjed biex jikkonsma gerbub sħiħ, it-tħin jew it-tkissir ma jibqax neċessarju. L-annimali għandhom jintemgħu darba kull jum. It-tagħlif tal-ħut li jkun għadu qed jikber għandu jippermetti tkabbir u żvilupp xierqa tal-organiżmi: hu rakkomandat piż medju fi ħdan 11,5 ± 3 g fil-ħut tal-kontroll li jkun għadu qed jikber fit-terminazzjoni tal-assaġġ.

Kimika analitika

35. Qabel it-tnedija tal-assaġġ, għandhom jiġu stabbiliti l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test (*eż.* is-solubbiltà, id-degradabbiltà, u l-volatilità) u l-metodi analitiċi kollha, *eż.* bl-użu tal-informazzjoni jew tal-għarfien eżistenti. Meta d-dożaġġ isir permezz tal-ilma ta' dilwizzjoni, hu rakkomandat li s-soluzzjonijiet tat-test minn kull tank ta' replika jiġu analizzati qabel it-tnedija tat-test biex tiġi verifikata l-prestazzjoni tas-sistema. Matul il-perjodu ta' esponiment, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli xierqa, idealment kull ġimgħa għal tal-anqas replika waħda f'kull grupp tat-trattament, b'rotazzjoni bejn ir-repliki tal-istess grupp tat-trattament kull ġimgħa. Hu rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla. Barra minn hekk, il-koeffiċjent ta' varjazzjoni (CV) tal-konċentrazzjonijiet tat-test imkejla tul il-perjodu sħiħ tat-test fi ħdan trattament għandu jinżamm għal 20 % jew anqas f'kull konċentrazzjoni. Meta l-konċentrazzjonijiet imkejla ma jibqgħux fi ħdan 80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali (pereżempju meta jiġu testjati sustanzi kimiċi ferm bijo-degradabbli jew assorbenti), il-konċentrazzjonijiet tal-effetti għandhom jiġu determinati u espressi b'rabta mal-konċentrazzjoni medja aritmetika għat-testijiet bi fluss kontinwu.

36. Ir-rati ta' fluss tal-ilma ta' dilwizzjoni u tas-soluzzjoni ewlenija għandhom jiġu verifikati f'intervalli xierqa (*eż.* tliet darbiet fil-ġimgħa) matul id-durata kollha tal-esponiment. Fil-każ ta' sustanzi kimiċi li ma jistgħux jiġu individwati fil-konċentrazzjonijiet nominali kollha jew f'uħud minnhom (*eż.* minħabba degradazzjoni jew assorbiment rapidi fir-reċipjenti tat-test, jew b'akkumulazzjoni kimika mmarkata fl-iġsma tal-annimali esposti), hu rakkomandat li r-rata ta' tiġdid tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment tiġi adattata biex il-konċentrazzjonijiet tat-test jinżammu kostanti kemm jista' jkun.

Osservazzjonijiet u kejlijiet tal-punti ta' tmiem

37. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment huma dawk indikativi tat-tossiċità inklużi l-mortalità, imġiba anormali bħal sinjali kliniċi ta' mard u/jew tossiċitajiet ġenerali, u d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (tul u piż), kif ukoll il-punti ta' tmiem tal-patoloġija li jistgħu jirrispondu għal modalitajiet ta' azzjoni tat-tossiċità ġenerali kif ukoll endokrinali mmirati lejn perkorsi medjati bl-estroġenu, bl-androġenu jew bit-tirojde. Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tista' titkejjel b'mod fakultattiv fit-terminazzjoni tal-assaġġ. Il-kejl tal-VTG jista' jkun siewi fil-fehim tar-riżultati tal-istudju fil-kuntest tal-mekkaniżmi endokrinali għall-EDCs suspettati. Il-punti ta' tmiem u t-tempestività tal-kejlijiet huma miġbura fil-qosor fit-Tabella 1.

Tabella 1

Ħarsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-LAGDA

Punti ta' Tmiem (*)	Kuljum	Kampjunar Interim (Kampjunar tal-larva)	Terminazzjoni tat-Test (Kampjunar tal-ħut li jkun għadu qed jikber)
Mortalità u anormalitajiet	X		
Żmien għall-istadju 62 ta' NF		X	
Isto(pato)loġija (glandola tat-tirojde)		X	
Morfometrika (tkabbir fil-piż u fit-tul)		X	X
Indiċi somatiku tal-fwied (LSI)			X
Proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku			X
Istopatoloġija (gonadi, kanali riproduttivi, kilwa u fwied)			X
Vitelloġenina (VTG) (fakultattiva)			X

(*) Il-punti ta' tmiem kollha jiġu analizzati statistikament

Il-mortalità u l-osservazzjonijiet ta' kuljum

38. It-tankijiet tat-test kollha għandhom jiġu verifikati kuljum għal annimali mejtin u l-mortalitajiet għandhom jiġu reġistrati għal kull tank. L-annimali mejtin għandhom jitneħħew mit-tank tat-test malli jiġu osservati. L-istadju tal-iżvilupp tal-annimali mejtin għandu jiġi kategorizzat bħala qabel l-istadju 68 ta' NF (emerġenza ta' qabel l-estremità ta' quddiem), l-istadju 58-62 ta' NF, l-istadju 63-66 ta' NF (bejn l-istadju 62 ta' NF u l-assorbiment tad-denb sħiħ), jew wara l-istadju 66 ta' NF (wara l-larva). Rati tal-mortalità li jaqbżu l-20 % jistgħu jindikaw kundizzjonijiet tat-test mhux xierqa jew effetti tossiċi ċari tas-sustanza kimika tat-test. L-annimali għandhom tendenza li jkunu sensittivi aktar għal avvenimenti tal-mortalità indotti mhux bil-kimika matul l-ewwel ftit jiem tal-iżvilupp wara l-avveniment ta' riproduzzjoni u matul il-climax metamorfika. Mortalità bħal din tista' tkun apparenti mid-*data* tal-kontroll.

39. Barra minn hekk, għandha tiġi reġistrata kwalunkwe osservazzjoni ta' mġiba anormali, ta' malformazzjonijiet viżibbli ċari (*eż.* skoljożi), jew ta' leżjonijiet. L-osservazzjonijiet ta' skoljożi għandhom jingħaddu (inċidenza) u jiġu gradati skont is-severità (*eż.* mhux rimarkabbli – NR, minima – 1, moderata – 2, severa – 3; Appendiċi 8). Għandhom jittieħdu sforzi biex jiġi żgurat li l-prevalenza ta' skoljożi moderata u severa tkun limitata (*eż.* anqas minn 10 % fil-kontrolli) matul l-istudju kollu, għalkemm prevalenza akbar ta' anormalitajiet fil-kontroll mhux bilfors tkun raġuni għat-twaqqif tat-test. Imġiba normali għal annimali larvali hi kkaratterizzata minn sospensjoni fil-kolonna tal-ilma bid-denb mgħolli 'l fuq fuq ir-ras, taħbit ritmiku regolari tal-pinna tad-denb, tlugħ perjodiku fil-wiċċ, operkulazzjoni, u risponsività għall-istimoli. Imġiba anormali tinkludi, pereżempju, meta jibqgħu fil-wiċċ, mimdudin f'qiegħ it-tank, jgħowmu b'lura jew b'mod irregolari, ma tantx ikunu attivi fil-wiċċ, u ma jkunux risponsivi għall-istimoli. Għall-annimali postmetamorfoċi, minbarra l-imġibiet anormali ta' hawn fuq, għandhom jiġu reġistrati differenzi kbar fil-konsum tal-ikel bejn it-trattamenti. Sfigurazzjonijiet u leżjonijiet kbar jistgħu jinkludi anormalitajiet morfoloġiċi (*eż.* deformitajiet tal-estremitajiet), leżjonijiet emorraġiċi, edema addominali, infezzjonijiet batterjali jew fungali, fost ħafna oħrajn. L-okkorrenzi ta' leżjonijiet fuq ras il-ħut li jkun għadu qed jikber, eżatt wara l-imnieħer, jistgħu jkunu indikazzjonijiet ta' livelli insuffiċjenti ta' umdità. Dawn il-kalkoli huma kwalitattivi u għandhom jitqiesu l-istess bħal sinjali kliniċi ta' mard/stress u jsiru f'paragun mal-annimali tal-kontroll. Jekk ir-rata ta' okkorrenza tkun akbar fit-tankijiet esposti milli fil-kontrolli, f'dak il-każ din għandha titqies bħala evidenza ta' tossiċità ċara.

Subkampjunar tal-larva

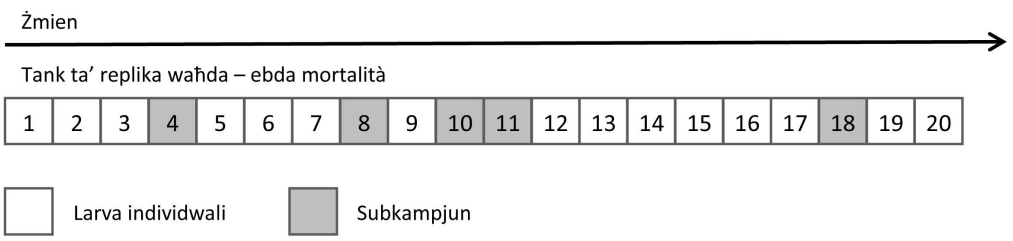
Spjegazzjoni tas-subkampjunar tal-larva:

40. L-imrieżeb li jilħqu l-istadju 62 ta' NF għandhom jitneħħew mit-tankijiet u jiġu kampjunati jew inkella jiġu mċaqlaqa għall-parti li jmiss tal-esponiment f'tank ġdid, jew inkella jiġu separati fiżikament mill-imrieżeb li jifdal fl-istess tank b'diviżur. L-imrieżeb jiġu verifikati ta' kuljum, u jiġi reġistrat il-jum tal-istudju li fih marżebb jilħaq l-istadju 62 ta' NF. Il-karatteristika definittiva għall-użu f'din il-valutazzjoni hi l-forma tar-ras. Ladarba r-ras tiċkien b'tali mod li bejn wieħed u ieħor tkun wiesgħa daqs il-korp tal-marżeb u l-estremitajiet ta' quddiem ikunu fil-livell tan-nofs tal-qalb, dak l-individwu jingħadd bħala li jkun laħaq l-istadju 62 ta' NF.

41. L-għan hu li jittieħed kampjun ta' ħames imrieżeb fl-istadju 62 ta' NF għal kull tank ta' replika. Dan għandu jsir b'mod għalkollox aleatorju, iżda deċiż *a priori*. Eżempju ipotetiku ta' tank ta' replika hu pprovdut fil-**Figura 1**. Jekk ikun hemm 20 marżebb li jibqgħu ħajjin f'tank partikolari meta l-ewwel individwu jilħaq l-istadju 62 ta' NF, għandhom jingħażlu ħames numri għal għarrieda minn 1-20. Il-marżebb #1 hu l-ewwel individwu li jlħaq l-istadju 62 ta' NF u l-marżebb #20 hu l-aħħar individwu f'tank li jilħaq l-istadju 62 ta' NF. Bl-istess mod, jekk ikun hemm 18-il larva li jibqgħu ħajjin f'tank, għandhom jintgħażlu ħames numri għal għarrieda minn 1-18. Dan għandu jsir għal kull tank ta' replika meta l-ewwel individwu fit-test jilħaq l-istadju 62 ta' NF. Jekk ikun hemm mortalitajiet matul l-ewwel kampjunar tal-istadju 62 ta' NF, il-kampjuni li jifdal iridu jerġgħu jintgħażlu b'mod aleatorju fuq il-bażi ta' kemm-il larva jkun fadal fl-istadju < 62 ta' NF u kemm-il kampjun ieħor ikun meħtieġ biex jintlaħaq total ta' ħames kampjuni minn dik ir-replika. Fil-jum li fih marżebb jilħaq l-istadju 62 ta' NF, isir riferiment għaċ-ċart tal-kampjunar imħejjija biex jiġi determinat jekk dak l-individwu jiġix kampjunat jew fiżikament separat mill-imrieżeb li jifdal għall-esponiment issoktat. Fl-eżempju pprovdut (Figura 1), l-ewwel individwu li jilħaq l-istadju 62 ta' NF (jiġifieri l-kaxxa #1) jiġi separat fiżikament mill-larva l-oħra, jibqa' jiġi espost u jiġi reġistrat l-jum tal-istudju li fih dak l-individwu jkun laħaq l-istadju 62 ta' NF. Imbagħad, l-individwi #2 u #3 jiġu trattati bl-istess mod bħal #1 u mbagħad l-individwu #4 jiġi kampjunat għat-tkabbir u għall-istoloġija tat-tirojde (skont dan l-eżempju). Din il-proċedura tkompli sakemm l-20 individwu jissieħeb mal-bqija tal-individwi ta' wara l-istadju 62 ta' NF jew inkella jiġi kampjunat. Il-proċedura għal għarrieda użata trid tagħti lil kull organiżmu tat-test probabbiltà ndaqs li jingħażel. Dan jista' jinkiseb billi jintuża kwalunkwe metodu ta' randomizzazzjoni, iżda jeħtieġ ukoll li kull marżebb jiġi nnettjat f'xi punt matul il-perjodu ta' subkampjunar tal-istadju 62 ta' NF.

Figura 1

Eżempju ipotetiku ta' reġim ta' kampjunar tal-istadju 62 ta' NF għal tank ta' replika wieħed



42. Għas-subkampjunar tal-larva, il-punti ta' tmiem miksuba huma: (1) iż-żmien għall-istadju 62 ta' NF (jiġifieri n-numru ta' jiem bejn il-fertilizzazzjoni u l-istadju 62 ta' NF), (2) l-anormalitajiet esterni, (3) il-morfometrika (*eż.* il-piż u t-tul) u (4) l-istoloġija tat-tirojde.

Il-qtil bl-ewtanażja tal-imrieżeb

43. Is-subkampjun ta' mrieżeb tal-istadju 62 ta' NF (5 individwi għal kull replika) għandu jiġi ewtanizzat b'immersjoni għal 30 minuta f'ammonti xierqa (*eż.* 500 ml) ta' soluzzjoni anestetika (*eż.* soluzzjoni ta' 0,3 % MS-222, sulfonat tal-metan trikaina, CAS.886-86-2). Is-soluzzjoni ta' MS-222 għandha tiġi bafferjata b'bikarbonat tas-sodju għal pH ta' bejn wieħed u ieħor 7,0 għaliex is-soluzzjoni mhux bafferjata ta' MS-222 hi aċiduża u irritanti għall-ġilda taż-żrinġijiet u tirriżulta f'assorbiment batut u għal stress addizzjonali żejjed għall-organiżmi.

44. Bl-użu ta' kopp bil-malji, marżebb jitneħħa mill-kompartiment sperimentali u jiġi trasportat (jitqiegħed) fis-soluzzjoni tal-ewtanażja. L-annimal jiġi ewtanizzat kif xieraq u jkun lest għan-nekroskopija meta ma jkunx responsiv għal stimoli esterni bħall-qris tal-estremità ta' wara b'par forċipi.

Morfometrika (il-piż u t-tul)

45. Il-kejlijiet tal-piż imxarrab (l-eqreb mg) u t-tul mill-imnieħer sal-bokka (SVL) (l-eqreb 0,1 mm) għal kull marżebb għandhom isiru eżatt wara li ma jibqax risponsiv b'anestetiku (Figura 2a). Jista' jintuża softwer ta' analiżi tal-immaġinijiet biex jitkejjel l-SVL minn ritratt. L-imrieżeb għandhom jiġu xxottati b'taptip qabel l-użin biex jitneħħa l-ilma aderenti żejjed. Wara li jittieħdu l-kejlijiet tal-qies tal-ġisem (piż u SVL), kwalunkwe anormalità morfoloġika ċara u/jew sinjal kliniku ta' tossiċità bħal skoljożi (ara l-Appendiċi 8), għandhom jiġu reġistrati jew innotati t-tbenġil u l-emorraġiji, u hi rakkomandata dokumentazzjoni diġitali. Kun af li t-tbenġil hu emorraġiji żgħar ħomor jew vjola fil-kapillari tal-ġilda.

Il-Ġbir u l-Fissazzjoni tat-Tessuti

46. Għas-subkampjun tal-larva, il-glandoli tat-tirojde jiġu vvalutati għall-istoloġija. It-torso inferjuri wara l-estremitajiet ta' quddiem jitneħħa u jintrema. Il-karkassa mirquma tiġi fissata f'fissattiv ta' Davidson. Il-volum tal-fissattiv fil-kontenitur għandu jkun tal-anqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. Għandha tinkiseb aġitazzjoni jew ċirkolazzjoni xierqa tal-fissattiv biex it-tessuti ta' interess jiġu fissati b'mod adegwat. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson għal tal-anqas 48 siegħa, iżda mhux għal aktar minn 96 siegħa, meta jitlaħalhu f'ilma dejonizzat u jinħażnu f'10 % formalina baferjata newtrali (1) (29).

Istoloġija tat-tirojde

47. Kull subkampjun tal-larva (tessuti fissati) jiġi valutat istoloġikament għall-glandoli tat-tirojde, jiġifieri djanjożi u gradazzjoni tas-severità (29) (30).

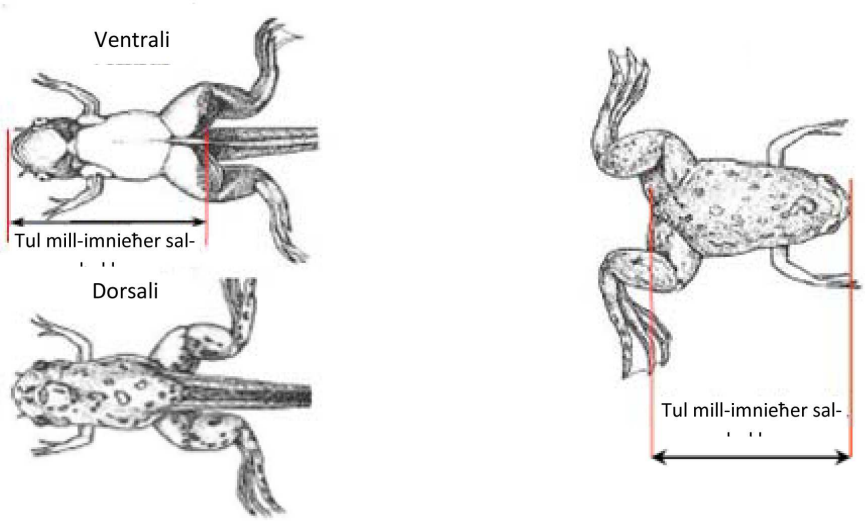


Figura 2: Il-punti ta' riferiment għall-kejl tat-tul mill-imnieħer sal-bokka għal-LAGDA fl-Istadju 62 ta' NF (a) u għażżriġijiet li jkunu għadhom qed jikbru (b). Il-karatteristiċi definittivi tal-istadju 62 ta' NF (a): ir-ras tkun l-istess wisgħa tal-ġisem, it-tul tal-nerv olfattiv ikun iqsar mid-dijametru tal-bulb olfattiv (perspettiva dorsali), u l-estremitajiet ta' quddiem ikunu fil-livell tal-qalb (perspettiva ventrali). Stampi adattati minn Nieuwkoop u Faber (1994).

Tmiem l-esponiment tal-larva

48. Fid-dawl tan-numru inizjali ta' mrieżeb, hu mistenni li aktarx li jkun hemm perċentwal żgħir ta' individwi li ma jiżviluppawx normalment u ma jlestux il-metamorfożi (stadju 66 ta' NF) f'ammont raġonevoli ta' żmien. Il-porzjon tal-larva tal-esponiment ma għandux jaqbeż is-70 jum. Kwalunkwe marżebb li jifdal fi tmiem dan il-perjodu għandu jiġi ewtanizzat (ara l-para. 43), jitkejlu l-piż imxarrab u l-SVL tiegħu, jitqassam fl-istadju skont Nieuwkoop u Faber, 1994, u għandha tittieħed nota ta' kwalunkwe anormalità fl-iżvilupp.

Qtil wara l-istadju 66 ta' NF

49. Għaxar individwi għal kull tank għandhom ikomplu mill-istadju 66 ta' NF (risorbiment tad-denb sħiħ) sat-terminazzjoni tal-esponiment. Għaldaqstant, wara li l-annimali kollha jilħaqu l-istadju 66 ta' NF jew wara 70 jum (skont liema jseħħ l-ewwel), għandu jsir il-qtil. Wara l-istadju 66 ta' NF l-annimali li ma jkunux ser ikomplu l-esponiment għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju.

50. L-annimali li ma jintgħażlux għall-esponiment issoktat jiġu ewtanizzati (ara l-para. 43). Għal kull annimali isiru l-kejlijiet tal-istadju tal-iżvilupp, tal-piż imxarrab u tal-SVL (Figura 2b) u nekroskopija grossa. Is-sess fenotipiku (fuq il-bażi tal-morfoloġija tal-gonadi) jiġi notat bħala femminili, maskili, jew indeterminat.

Kampjunar taż-Żrinġijiet li Jkunu Għadhom Qed Jikbru

Spjegazzjoni tal-kampjunar taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru

51. L-annimali li jifdal ikomplu bl-esponiment sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni (u/jew il-kontroll b'solvent jekk rilevanti). Wara tmiem il-perjodu ta' esponiment, l-annimali li jifdal (massimu ta' 10 żrinġijiet għal kull replika) jiġu ewtanizzati, u d-diversi punti ta' tmiem jitkejlu jew inkella jiġu evalwati u reġistrati: (1) il-morfometrika (piż u tul), (2) il-proporzjonijiet tas-sess fenotipiku/ġenotipiku, il-piż tal-fwied (Indiċi Somatiku tal-Fwied), (4) l-istopatoloġija (gonadi, kanali riproduttivi, fwied u kilwa) u, mhux bilfors, (5) il-VTG fil-plażma.

Il-qtil bl-ewtanażja tal-imrieżeb

52. Il-kampjuni ta' żrinġijiet postmetamorfiċi li jkunu għadhom qed jikbru jiġu ewtanizzati b'injezzjoni intraperitoneali ta' anestetiku, *eż.* 10 % MS-222 f'soluzzjoni baferjata tal-fosfat xierqa. Iż-żrinġijiet jistgħu jiġu kampjunati wara li ma jibqgħux risponsivi (normalment madwar 2 min wara l-injezzjoni, jekk jituża 10 % MS-222 f'doża ġġ ta' 0,01 ml għal kull g żrinġ). Filwaqt li ż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru jistgħu jitgħaddsu f'konċentrazzjoni ogħla ta' anestetiku (MS-222), l-esperjenza wriet li dawn jieħdu aktar żmien biex jiġu anestetizzati bl-użu ta' dan il-metodu u d-durata jaf ma tkunx adegwata biex tippermetti għall-kampjunar. L-injezzjoni tipprovdi ewtanażja effiċjenti u veloċi qabel il-kampjunar. Il-kampjunar ma għandux jinbeda sakemm jiġi kkonfermat in-nuqqas ta' risponsività taż-żrinġijiet biex jiġi żgurat li l-annimali jkunu mejtin. Jekk iż-żrinġijiet ikunu qed juru sinjali ta' tbatija konsiderevoli (serji ħafna u mewt jistgħu jitbassru b'mod affidabbli) u jitqiesu moribundi, l-annimali għandhom jiġu anestetizzati u ewtanizzati u trattati bħala mortalità għall-analiżi tad-*data*. Meta żrinġ jiġi ewtanizzat minħabba morbiditá, dan għandu jiġi notat u rapportat. Skont meta ż-żrinġ jiġi ewtanizzat matul l-istudju, iż-żrinġ jista' jinżamm għall-analiżi tal-istopatoloġija (iffissar taż-żrinġ għall-istopatoloġija possibbli).

Morfometrika (il-piż u t-tul)

53. Il-kejlijiet tal-piż imxarrab u tal-SVL (Figura 2b) huma identiċi għal dawk spjegati għas-subkampjunar tal-larva.

VTG fil-plażma (fakultattiva)

54. Il-VTG hi bijomarkatur aċċettat b'mod ġenerali li jirriżulta mill-esponiment għal sustanzi kimiċi estroġeniċi. Għal-LAGDA, il-VTG fil-plażma tista' titkejjel, iżda mhux bilfors, fi ħdan kampjuni ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru (din tista' tkun partikolarment rilevanti jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tkun estroġenu).

55. L-estremitajiet ta' wara taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru jinqatgħu u d-demm jinġabar b'kapillari eparinizzata (għalkemm jistgħu jkunu xierqa metodi alternattivi għall-ġbir tad-demm, bħat-titqib kardijaku). Id-demm jinħeles f'tubu tal-mikroċentrifugu (*eż.* volum ta' 1,5 ml) u jiġi ċentrifugat biex tinkiseb il-plażma. Il-kampjuni tal-plażma għandhom jinħażnu f'-70 °C jew anqas sad-determinazzjoni tal-VTG. Il-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tista' titkejjel b'metodu ta' assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiku (ELISA) (Appendiċi 6), jew b'metodu alternattiv bħall-ispettrometrija tal-massa (31). Antikorpi speċifiċi tal-ispeċijiet huma preferuti minħabba sensittività akbar.

Determinazzjoni tas-sess ġenetiku

56. Is-sess ġenetiku ta' kull żriniġ li jkun għadu qed jikber jiġi vvalutat fuq il-bażi tal-markaturi żviluppati minn Yoshimoto *et al.* (11). Biex jiġi determinat is-sess ġenetiku, porzjon (jew biċċa sħiħa) ta' estremità waħda ta' wara (jew kwalunkwe tessut ieħor) imneħħi matul id-dissezzjoni jinġabar u jinħażen f'tubu tal-mikroċentrifugazzjoni (kampjuni tat-tessut miż-żriniġijiet jistgħu jinkisbu minn kwalunkwe tessut). It-tessut jista' jinħażen f'-20 °C jew anqas sal-iżolament tal-aċidu nuklejku deossiriboż (DNA). L-iżolament tad-DNA mit-tessuti jista' jsir b'kits kummerċjalment disponibbli u l-analiżi għall-preżenza jew għall-assenza tal-markatur issir b'metodu ta' reazzjoni katina bil-polimeraży (PCR) Appendiċi 5). Ġeneralment, il-konkordanza bejn is-sess istoloġiku u l-ġenotip fost l-annimali tal-kontroll fil-punt ta' żmien tal-kampjuanr taż-żriniġijiet li jkunu għadhom qed jikbru fil-gruppi tal-kontroll tkun ta' aktar minn 95 %.

Il-ġbir u l-fissazzjoni tat-tessuti għall-istopatoloġija

57. Il-gonadi, il-kanali riproduttivi, il-kliewi u l-fwied jinġabru għall-analiżi istoloġika matul il-kampjunar finali. Tinfetaħ il-kavità tal-addome, u l-fwied jiġi dissezzjonat u jintiżen. Imbagħad, l-organi diġestivi (*eż.* l-istonku, l-intestini) jitneħħew bir-reqqa mill-addome inferjuri biex jinkixfu l-gonadi, il-kliewi u l-kanali riproduttivi. Għandha tiġi nnotata kwalunkwe anormalità morfoloġika gross fil-gonadi. Finalment, l-estremitajiet ta' wara għandhom jitneħħew jekk ma jkunux tneħħew qabel għall-ġbir tad-demm. Il-fwied miġbur u l-karkassa bil-gonadi mħallija *in situ* għandhom jitqiegħdu f'fissattiv ta' Davidson minnufih. Il-volum tal-fissattiv fil-kontenitur għandu jkun tal-anqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson għal tal-anqas 48 siegħa, iżda mhux għal aktar minn 96 siegħa, meta jitlaħalħu f'ilma dejonizzat u jinħażnu f'10 % formalina baferjata newtrali (1) (29).

Istopatoloġija

58. Kull kampjun ta' żriniġijiet żgħar li jkunu għadhom qed jikbru jiġi evalwat istoloġikament għall-patoloġija fil-gonadi, fil-kanali riproduttivi, fil-kliewi u fit-tessut tal-fwied, jiġifieri djanjożi u gradazzjoni tas-severità (32). Il-fenotip tal-gonadi jinkiseb minn din l-evalwazzjoni wkoll (*eż.* l-ovarju, it-testikoli, l-intersess), u flimkien mal-kejljiet individwali tas-sess ġenetiku, dawn l-osservazzjonijiet jistgħu jintużaw biex jiġu kkalkolati l-proporzjonijiet tas-sess fenotipiku/ġenotipiku.

DATA U RAPPORTAR

Analiżi statistika

59. Il-LAGDA jiġġenera tliet forom ta' *data* li jridu jiġu analizzati statistikament: (1) *data* kontinwa kwantitattiva (piż, SVL, LSI, VTG), (2) id-*data* dwar iż-żmien sal-avveniment għar-rati ta' żvilupp (jiġifieri jiem sal-istadju 62 ta' NF mit-tnedija tal-assaġġ) u (3) id-*data* ordinali fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew tal-istadji tal-iżvilupp mill-evalwazzjonijiet tal-istopatoloġija.

60. Hu rakkomandat li d-disinn tat-test u l-għażla tat-test statistiku jippermettu saħħa adegwata li jiġu individwati tibdiliet ta' importanza bijoloġika f'punti ta' tmiem fejn trid tiġi rapportata NOEC jew ECx. Idealment, l-analiżijiet statistiċi tad-*data* (ġeneralment, replika tfisser bażi) għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument dwar l-Approċċi Kurrenti fl-Analiżi Statistika tad-Data dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (33). L-Appendiċi 7 ta' dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi s-siġra tad-deċiżjonijiet tal-analiżi statistika u gwida rakkomandati għat-trattament tad-*data* u fl-għażla tal-aktar test jew mudell statistiku xieraq li għandu jintuża fil-LAGDA.

61. Id-*data* mill-kampjunar taż-żriniġijiet li jkunu għadhom qed jikbru (*eż.*, tkabbir, LSI) għandha tiġi analizzata għal kull sess ġenotipiku b'mod separat peress li s-sess ġenotipiku jiġu determinat għaż-żriniġijiet kollha.

Kunsiderazzjonijiet għall-analiżi tad-*data*

Użu ta' repliki u ta' trattamenti kompromessi

62. Repliki u trattamenti jistgħu jsiru kompromessi minħabba mortalità eċċessiva minn tossiċità ċara, minn mard jew minn errur tekniku. Jekk trattament ikun kompromess minn marda jew minn errur tekniku, għandu jkun hemm tliet trattamenti mhux kompromessi bi tliet repliki mhux kompromessi disponibbli għall-analiżi. Jekk isseħħ tossiċità ċara fit-trattament(i) għoli/għoljin, idealment ikun hemm tal-anqas tliet livelli ta' trattament bi tliet repliki mhux kompromessi disponibbli għall-analiżi (konsistenti mal-approċċ tal-Konċentrazzjoni Massima Tollerata għal-linji gwida tat-test tal-OECD (34)). Minbarra l-mortalità, sinjali ta' tossiċità ċara jistgħu jinkludu effetti fuq l-imġiba (eż. żamma fil-wiċċ, tluq fil-qiegħ tat-tank, għawm invertit jew irregolari, nuqqas ta' attività ta' tlugħ fil-wiċċ), leżjonijiet morfoloġiċi (eż. leżjonijiet emorraġiċi, edema addominali) jew inibizzjoni ta' risponsi normali tat-tagħlif meta mqabbla b'mod kwalitattiv ma' annimali tal-kontroll.

Kontrolli tas-solvent

63. Fit-terminazzjoni tat-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent (jekk jintuża). Dan isir permezz ta' paragun statistiku tal-grupp ta' kontroll b'solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. L-aktar punti ta' tmiem relevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analiżi huma d-determinanti tat-tkabbir (piż u tul), peress li dawn jistgħu jkunu affettwati permezz ta' tossiċitajiet ġeneralizzati. Jekk jinstabu differenzi statistikament sinifikanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-gruppi tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni u tal-kontroll b'solvent, għandu jintuża l-aħjar ġudizzju professjonali biex jiġi determinat jekk il-validità tat-test hix f'riskju. Jekk iż-żewġ kontrolli jvarjaw, it-trattamenti esposti għas-sustanza kimika għandhom jitqabblu mal-kontroll b'solvent sakemm ma jkunx magħruf li jkun preferut it-tqabbil mal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn iż-żewġ gruppi tal-kontroll, hu rakkomandat li t-trattamenti esposti għas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mar-raggruppati (gurppi tal-kontroll b'solvent u bl-ilma ta' dilwizzjoni), sakemm ma jkunx magħruf li t-tqabbil mal-grupp tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni jew tal-kontroll b'solvent biss hu preferut.

Rapport tat-test

64. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test:

— L-għamla fiżika u, fejn rilevanti, il-proprjetajiet fiżjokimiċi;

— Sustanza monokostitwenti:

id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;

identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impuritajiet bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

— Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test:

— L-isem xjentifiku, ir-razza jekk disponibbli, is-sors u l-metodu tal-ġbir tal-bajd fertilizzat, u l-immaniġġjar sussegwenti.

— L-inċidenza tal-iskoljożi f'kontrolli storiċi għall-koltura ewlenija użata.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— Il-fotoperjodu/i;

— Id-disinn tat-test (*eż.* id-daqs tal-kompartiment, il-materjal u l-volum tal-ilma, in-numru ta' kompartimenti u ta' repliki tat-test, in-numru ta' organiżmi għal kull replika);

— Il-metodu ta' tħejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-frekwenza tat-tiġdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);

— Il-metodu li jintuża għad-dożaġġ tas-sustanza kimika tat-test (*eż.* pompi, sistemi ta' dilwizzjoni);

— L-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu li permezz tiegħu nkisbu u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;

— Il-karatteristiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli tal-kloru residwu (jekk jitkejjel), il-karbonju organiku totali (jekk jitkejjel), il-jodju totali, is-solidi sospiżi (jekk jitkejlu), is-salinità tal-medium tat-test (jekk titkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir;

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom;

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, it-temperatura (ta' kuljum) u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;

— Informazzjoni dettaljata dwar it-tagħlif (*eż.* it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza).

Ir-riżultati:

— Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji ta' validità;

— Id-*data* għall-kontroll (flimkien mal-kontroll b'solvent meta jintuża) u għall-gruppi tat-trattament kif ġej: il-mortalità u l-anormalità osservati, iż-żmien sal-istadju 62 ta' NF, il-valutazzjoni tal-istoloġija tat-tirojde (kampjun tal-larva biss), it-tkabbir (il-piż u t-tul), LSI (kampjun ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss), il-proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku (kampjun ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss), ir-riżultati tal-valutazzjoni tal-istopatoloġija għall-gonadi, għall-kanali riproduttivi, għall-kilwa u għall-fwied (kampjun taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss) u l-VTG fil-plażma (kampjun taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss, jekk issir);

— L-approċċ għall-analiżi statistika u għat-trattament tad-*data* (it-testijiet statistiċi u l-mudelli użati);

— Il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) għal kull rispons ivvalutat;

— Il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) għal kull rispons ivvalutat ($f'\alpha$ = 0,05); L-ECx għal kull rispons ivvalutat, jekk applikabbli, u l-intervalli ta' kunfidenza (*eż.* 95 %) u graff tal-mudell imdaħħal għall-kalkolu tagħha, il-pendil tal-kurva konċentrazzjoni rispons, il-formula tal-mudell ta' rigressjoni, il-parametri stmati tal-mudell u l-erruri standard tagħhom.

— Kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu ta' ttestjar u devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni, u konsiderazzjonijiet tal-konsegwenzi potenzjali fuq l-eżitu tat-test.

65. Għar-riżultati tal-kejlijiet tal-punti ta' tmiem, għandhom jiġu ppreżentati l-valuri medji u d-devjazzjonijiet standard tagħhom (kemm fuq bażi ta' repliki kif ukoll fuq bażi ta' konċentrazzjoni, jekk possibbli).

66. Iż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli għandu jiġi kkalkolat u ppreżentat bħala l-medja tal-medjani tar-repliki u d-devjazzjoni standard tagħhom. Bl-istess mod, għat-trattamenti, medjan tat-trattament għandu jiġi kkalkolat u ppreżentat bħala l-medja tal-medjani tar-repliki u d-devjazzjoni standard tagħhom.

DOKUMENTAZZJONI

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(3) Nieuwkoop PD u Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, l-Istati Uniti.

(4) Kloas W u Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I u Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S u Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K u Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K u Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T u Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S u Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J u Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR u Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A u Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, l-Istati Uniti.

(17) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, It-Test Bijodegradabbiltà Lesta.

(18) Il-Kapitolu C.29 ta' dan l-Anness, Il-Bijodegradabbiltà Lesta - CO2 f'reċipjenti ssiġillati (Test tal-Ispazju Vojt Fuqani).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL u Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ u Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, l-Istati Uniti.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Ir-Renju Unit, 84 pp.

(25) Il-Kapitolu C.38 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Anfibji.

(26) Il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness: Assaġġ dwar ir-Riproduzzjoni Fuq Terminu Qasir tal-Ħut.

(27) Il-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut.

(28) Il-Kapitolu C.49 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta fuq l-Embrijuni tal-Ħut (FET).

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC u Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG u Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Punt ta' tmiem apikali: Li jikkaġuna effett fil-livell tal-popolazzjoni.

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew taħlita

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku

ECx: (Konċentrazzjoni effettiva għal effett ta' x %) hi l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organiżmi tat-test f'perjodu ta' esponiment partikolari meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC50 hi konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' esponiment definit.

dpf: Jiem wara l-fertilizzazzjoni

Test bi fluss kontinwu: Test bi fluss kontinwu ta' soluzzjonijiet tat-test fis-sistema tat-test matul id-durata tal-esponiment.

Assi HPG: assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali

IUPAC: Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata.

Konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC): hi l-anqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test li fiha tiġi osservata s-sustanza kimika biex ikollha effett statistikament sinifikanti (f'$p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha li jkunu ogħla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż daqs jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni shiha dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC). L-Appendiċi 7 jipprovdu gwida.

Konċentrazzjoni Letali Medjana (LC50): hi l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li hi stmata li tkun letali għal 50 % tal-organiżmi tat-test fid-durata tat-test.

Konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC): hi l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC, li meta mqabbla mal-kontroll, ma jkollha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$), f'perjodu ta' esponiment ddikjarat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew taħlita li tkun qiegħda tiġi ttestjata permezz ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

UVCB: Sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

VTG: Vitelloġenina hi prekursur tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment iseħħ f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

Appendiċi 2

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjoni ta' limitu
Materja partikulata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromu	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Ħadid	1 µg/l
ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

Appendiċi 3

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST GĦAL-LAGDA

1. Speċijiet tat-test	*Xenopus laevis*
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu,
3. Temperatura tal-ilma	It-temperatura nominali hi ta' 21 °C. It-temperatura medja tul id-durata tat-test hi ta' 21 ± 1 °C (id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbżu l-1,0 °C)
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa') 600-2000 lux (lumens/m^2) fis-superfiċje tal-ilma
5. Fotoperjodu	12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam
6. Volum tas-soluzzjoni tat-test u reċipjent tat-test (tank)	4-10 l (fond minimu ta' 10–15 cm tal-ilma) Tank tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli
7. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Kostant, f'kunsiderazzjoni kemm taż-żamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll tal-esponiment għas-sustanza kimika (*eż.* tiġdid tal-volum tat-tank għal ħames darbiet kull jum)
8. Età tal-organiżmi tat-test fil-bidu	Stadju 8-10 ta' Nieuwkoop u Faber (NF)
9. In-numru ta' organiżmi għal kull replika	20 annimal (embrijuni)/tank (replika) fil-bidu tal-esponiment u 10 annimali (li jkunu għadhom qed jikbru)/tank (replika) wara l-istadju 66 ta' NF sat-terminazzjoni tal-esponiment
10. In-numru ta' trattamenti	Minimu ta' erba' trattamenti bis-sustanza kimika tat-test flimkien mal-kontroll(i) xieraq/xierqa
11. In-numru ta' repliki għal kull trattament	Erba' repliki għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u 8 repliki għall-kontroll(1)
12. In-numru ta' organiżmi għal kull konċentrazzjoni tat-test	Minimu ta' 80 annimal għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u minimu ta' 160 annimal għall-kontroll(1)
13. Ilma ta' dilwizzjoni	Kwalunkwe ilma li jippermetti tkabbir u żvilupp normali ta' *X. laevis* (*eż.* ilma tan-nixxiegħa jew ilma tal-vit iffiltrat bil-faħam)
14. Ossiġenazzjoni	Ebda meħtieġa, iżda l-ossiġenazzjoni tat-tankijiet tista' tkun neċessarja jekk il-livelli ta' ossiġenu dissolt jonqsu anqas mil-limiti rakkomandati u ż-żidiet fil-fluss tas-soluzzjonijiet tat-test ikunu massimizzati.
15. Ossiġenu dissolt tas-soluzzjoni tat-test	Ossiġenu dissolt: ≥ 40 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja jew ≥ 3,5 mg/l

16. Il-pH tas-soluzzjoni tat-test	6,5-8,5 (id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbżu iż-0,5)
17. L-ebusija u l-alkalinità tas-soluzzjoni tat-test	10-250 mg $CaCO_3$/l
18. Reġim tal-għalf	(Ara l-Anness 4)
19. Perjodu ta' esponiment	Mill-istadju 8-10 ta' NF sa għaxar ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-grupp tal-kontroll bl-ilma u/jew b'solvent (massimu ta' 17-il ġimgħa)
20. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	Il-mortalità (u dehriet anormali), iż-żmien sal-istadju 62 ta' NF (kampjun tal-larva), il-valutazzjoni tal-istoloġija tat-tirojde (kampjun tal-larva), it-tkabbir (il-piż u t-tul), l-indiċi somatiku tal-fwied (kampjun ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru), il-proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku (kampjun ta' żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru), l-istopatoloġija għall-gonadi, għall-kanali riproduttivi, għall-kilwa u għall-fwied (kampjun taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru) u l-vitelloġenina fil-plażma (kampjun taż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru, mhux obbligatorja);
21. Kriterji ta' validità tat-test	L-ossiġenu dissolt għandu jkun ta' > 40 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja; it-temperatura medja tal-ilma għandha tkun ta' 21 ± 1 °C u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti għandhom ikunu < 1,0 °C; il-pH tas-soluzzjoni tat-test għandha tkun fil-medda ta' bejn 6,5 u 8,5; il-mortalità fil-kontroll għandha tkun ta' ≤ 20 % f'kull replika, u ż-żmien medju għall-istadju 62 ta' NF fil-kontroll għandu jkun ta' ≤ 45 jum; il-piż medju tal-organiżmi tat-test fl-istadju 62 tal-NF u fit-terminazzjoni tal-assaġġ fil-kontrolli u fil-kontrolli b'solvent (jekk użati) għandu jilħaq il-1,0 ± 0,2 u 11,5 ± 3 g, rispettivament; l-evidenza għandha tkun disponibbli biex jintwera li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-valuri medji mkejlin.

Appendiċi 4

REĠIM TAL-GĦALF

Ta' min jinnota li għalkemm dan ir-reġim tal-għalf hu rakkomandat, alternattivi huma possibbli dment li l-organiżmi tat-test jikbru u jiżviluppaw b'rata xierqa.

Tagħlif tal-larva

Tħejjija għad-dieta tal-larva

A. 1:1 (v/v) Ikel tal-Bidu tat-Troti: algi/TetraFin® (jew ekwivalenti);

1. Ikel tal-Bidu tat-Troti: ħallat 50 g Ikel tal-Bidu tat-Troti (granuli jew trab fini) u 300 ml ilma filtrat xieraq f'issettjar għoli tal-blender għal 20 sekonda

2. Taħlita ta' algi/TetraFin® (jew ekwivalenti): ħallat 12-il g diski tal-alga spirulina u 500 ml ilma filtrat f'issettjar għoli tal-blender għal 40 sekonda, ħallat 12-il g Tetrafin® (jew ekwivalenti) ma' 500 ml ilma filtrat u mbagħad ħallathom biex tifforma 1 l ta' 12-il g/l alga spirulina u 12-il g/l Tetrafin®(jew ekwivalenti)

3. Għaqqad volumi ndaqs tal-Ikel tal-Bidu tat-Trodi mħallat u tat-taħlita ta' algi/Tetrafin®(jew ekwivalenti)

B. Gamblu tal-ilma mielaħ:

15-il ml bajd tal-gamblu tal-ilma mielaħ jfaqqsu f'litru (1 l) ilma mielaħ (imħejji biż-żieda ta' 20 ml NaCl ma' litru (1) ilma dejonizzat). Wara ossiġenazzjoni għal 24 siegħa f'temperatura ambjentali taħt dawl kostanti, il-gambli tal-ilma mielaħ jingabru. Għal ftit ħin, il-gambli tal-ilma mielaħ jitħallew jissetjiljaw għal 30 min bit-twaqqif tal-ossiġenazzjoni. Ċisti li jżommu fil-wiċċ tal-kannestru jitbattlu u jintremew, u l-gambli jitferrgħu ġol-filtri xierqa u jingħiebu għal 30 ml bl-ilma filtrat.

Protokoll tat-Tagħlif

It-Tabella 1 tipprovdi referenza rigward it-tip u l-ammont ta' għalf użati matul l-istadji tal-larva tal-esponiment. L-annimali għandhom jintemgħu tliet darbiet kull jum mit-Tnejn sal-Ġimgħa u darba kull jum fi tmiem il-ġimgħa.

Tabella 1

Ir-reġim tal-għalf għal-larva *X. laevis* f'kundizzjonijiet ta' fluss kontinwu

Żmien (*) (Wara l-Fertilizzazzjoni)	Ikel tal-Bidu tat-Troti: algi/TetraFin®(jew ekwivalenti)		Gamblu tal-Ilma Mielaħ	
	Matul il-ġimgħa (tliet darbiet kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)	Matul il-ġimgħa (darbtejn kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)
Jiem 4-14 (fil-Ġimgħat 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (mill-Jum 8 sa 15) 1 ml (mill-Jum 16)	0,5 ml (mill-Jum 8 sa 15) 1 ml (mill-Jum 16)
Ġimgħa 2	0,67 ml	2,4 ml		
Ġimgħa 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Ġimgħa 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Ġimgħa 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

Żmien (*) (Wara l-Fertilizzazzjoni)	Ikel tal-Bidu tat-Troti: algi/TetraFin®(jew ekwivalenti)		Gamblu tal-Ilma Mielaħ	
	Matul il-ġimgħa (tliet darbiet kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)	Matul il-ġimgħa (darbtejn kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)
Ġimgħa 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Ġimgħa 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Ġimgħat 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Il-Jum 0 hu definit bħala l-jum li fih issir l-injezzjoni tal-hCG.

Tranżizzjoni mid-dieta tal-larva għal dik ta' annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Hekk kif il-larva tlesti l-metamorfosi, tagħmel tranżizzjoni lejn formulazzjoni ta' dieta għal annimali li jkunu għadhom qed jikbru spjegata hawn taħt. Filwaqt li tkun qed issehħ din it-tranżizzjoni, id-dieta tal-larva għandha titnaqqas hekk kif jiżdied l-għalf għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru. Dan jista' jinkiseb billi jitnaqqas b'mod proporzjonat l-għalf għal-larva filwaqt li jiżdied b'mod proporzjonat l-għalf għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru ħekk kif kull grupp ta' ħames imrieżeb jaqbeż l-istadju 62 ta' NF u joqrob lejn it-tlestija tal-metamorfosi fl-istadju 66 ta' NF.

Tagħlif tal-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Dieta għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Ladarba titlesta l-metamorfosi (stadju 66), ir-reġim tat-tagħlif jinbidel għal ikel taż-żrinġijiet primjm li jinżel fil-qiegħ ta' 3/32 pulzier (Xenopus Express™, FL, l-Istati Uniti), jew ekwivalenti.

Tħejjija tal-gerbub imfarrak għat-tranżizzjoni mil-larva għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Il-gerbub tal-ikel taż-żrinġijiet li jinżel fil-qiegħ jingħadda fil-qosor minn mitħan tal-kafè, minn blender jew minn mehrież u lida biex jitnaqqas id-daqs tal-gerbub b'bejn wieħed u ieħor 1/3. Proċessar twil wisq jirriżulta fi trab u mhuwiex imħeġġeġ.

Protokoll tat-tagħlif

It-Tabella 2 tipprovdi referenza rigward it-tip u l-ammont ta' għalf użati matul l-istadji tal-annimali li jkunu għadhom qed jikbru u tal-ħajja adulta. L-annimali għandhom jintemgħu darba kull jum. Ta' min jinnota li hekk kif l-annimali jimmetamorfizzaw, dawn jibqgħu jirċievu porzjon tal-gambli tal-ilma mielaħ sa > 95 % tal-metamorfosi kompluta tal-annimali.

L-annimali ma għandhomx jingħataw għalf dakinhar tat-terminazzjoni tat-test biex l-għalf ma jfixkilx il-kejlijiet tal-piż.

Tabella 2

Ir-reġim tal-għalf għall-X. laevis li jkunu għadhom qed jikbru f'kundizzjonijiet ta' fluss kontinwu. Ta' min jinnota li l-annimali mhux metamorfizzati, li jinkludu dawk li l-metamorfosi tagħhom tkun ġiet ittardjata mit-trattament kimiku, ma jistgħux jieklu gerbub mhux imfarrak.

Żmien (*) (Ġimgħat wara d-data medjana tal-metamorfosi)	Gerbub imfarrak (mg għal kull żgħir taż-żrinġ)	Gerbub sħiħ (mg għal kull żgħir taż-żrinġ)
Hekk kif l-annimali jlestu l-metamorfosi	25	0
Ġimgħat 0-1	25	28
Ġimgħat 2-3	0	110
Ġimgħat 4-5	0	165
Ġimgħat 6-9	0	220

(*) L-ewwel jum tal-Ġimgħa 0 hi d-data medjana tal-metamorfosi fl-annimali tal-kontroll.

Appendiċi 5

DETERMINAZZJONI TAS-SESS ĠENETIKU (TQASSIM SKONT IS-SESS ĠENETIKU)

Il-metodu ta' tqassim skont is-sess ġenetiku għal *Xenopus laevis* hu bbażat fuq Yoshimoto *et al.*, 2008. Il-proċeduri f'dettall dwar il-ġenotipar jistgħu jinkisbu minn din il-pubblikazzjoni, jekk ikun hemm bżonn. Jistgħu jintużaw metodi alternattivi (eż. qPCR bi throughput għoli) jekk jitqiesu xierqa.

Primers ta' X. laevis

Markatur tad-DM-W

'Il quddiem:: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Kontra:: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Kontroll Pożittiv

'Il quddiem:: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Kontra:: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purifikazzjoni tad-DNA

Ippurifika d-DNA mit-tessut tal-muskolu jew tal-ġilda bl-użu ta', eż., Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (kat # 69 506) jew prodott simili skont l-istruzzjonijiet tal-kit. Id-DNA jista' jiġi elwit mill-kolonni dawwara bl-użu ta' anqas bafer biex jintrendew kampjuni aktar konċentrati jekk dawn jitqiesu neċessarji għall-PCR. Kun af li d-DNA hu pjuttost stabbli, u allura għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata li tista' twassal għal karatterizzazzjoni ħażina tal-irġiel bħala nisa, jew viċi versa.

PCR

Protokoll kampjun li juża JumpStart^{TM}*Taq* mingħand Sigma hu spjegat fit-**Tabella 1**.

Tabella 1

Protokoll kampjun li juża JumpStart^{TM}*Taq* mingħand Sigma

Il-Master Mix	1x (µl)	[Finali]
NFW ([1])	11	-
10X Bafer	2,0	-
$MgCl_2$ (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (10mM kull wieħed)	0,4	200 µM
Markatur għall-primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Primer kontra tal-markatur (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontroll għall-primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Primer kontra tal-kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM

Il-Master Mix	1x (µl)	[Finali]
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unitajiet/µl
Mudell tad-DNA	1,0	~200 pg/µl

([1]) Ilma bla nukleaži
Nota: Meta jitħejjew Master Mixes, ħejji ż-żejda biex jikkumpensaw għal kwalunkwe telf li jista' jseħħ matul il-pipettar (eżempju: għandhom jintużaw 25x għal 24 reazzjoni biss).

Reazzjoni:

Il-Master Mix	19,0 µl
Mudell	1,0 µl
Total	20,0 µl

Profil Termoċiklatur:

Stadju 1.	94 °C	1 min
Stadju 2.	94 °C	30 sek
Stadju 3.	60 °C	30 sek
Stadju 4.	72 °C	1 min
Stadju 5.	Mur għall-istadju 2.	35 ċiklu
Stadju 6.	72 °C	1 min
Stadju 7.	4 °C	żomm

Prodotti tal-PCR jistgħu jintużaw minnufih f'ġel jew jinħażnu f'4 °C.

Elettroforeżi tal-Ġel Agarożi (3 %)(protokoll kampjun)

50X TAE

Tris	24,2 g
Aċidu aċetiku glaċjali	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Żid l-ilma għal 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 Agarożi

3 partijiet agarożi NuSieve™ GTG™

parti (1) elettroendosmożi (EEO) baxxa agarożi Fisher

Metodu

1. Ħejji ġel ta' 3 % billi żżid 1,2 g taħlita ta' agarożi ma' 43 ml 1X TAE. Ħawwad biex tifred tagħqid kbir.

2. Ixħet it-taħlita tal-agarożi fil-microwave sakemm tinħall għalkollox (evita t-togħlija). Ħalliha tibred ftit.

3. Żid 1,0 µL bromur tal-etidju (10 mg/ml). Ħawwad il-flask. Kun af li l-bromur tal-etidju hu mutaġeniku, allura, sa fejn possibbli, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi alternattivi għal dan l-istadju biex jiġu minimizzati r-riskji għas-saħħa tal-ħaddiema ([2]).

4. Ferra' l-ġel f'forma b'moxt. Ħalli jibred għalkollox.

5. Żid il-ġel fuq l-apparat. Iksi l-ġel b'1X TAE.

6. Żid 1 µl 6x kulurant tat-tgħabbija ma' kull 10 µl prodott tal-PCR.

7. Bil-pipetta ixħet kampjuni fil-bwejriet.

8. Ħaddem b'160 volt kostanti għal ~20 minuta.

Stampa tal-ġel tal-agarożi li turi l-mudelli tal-banda li jindikaw individwi maskili u femminili hi pprovduta fil-**Figura 1**.

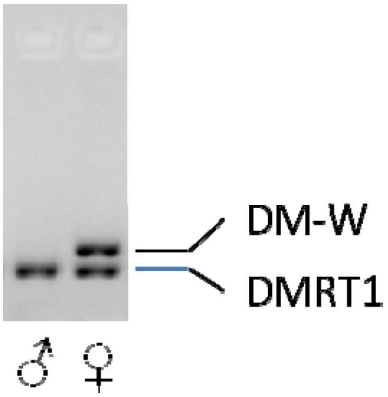


*Figura 1***Stampa tal-ġel tal-agarożi li turi l-mudell tal-banda li jindika individwu raġel (♂) (banda waħda ~203 bp: DMRT1) u ta' individwu mara (♀) (żewġ bandi f'~259 bp: DM-W u 203 bp:DMRT1).**

DOKUMENTAZZJONI

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

([2]) F'konformità mal-Artikolu 4.1 tad-Direttiva 2004/37/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tad-29 ta' April 2004 dwar il-protezzjoni tal-ħaddiema minn riskji relatati mal-esposizzjoni għal karċinoġeni jew mutaġeni fuq il-post tax-xogħol (Sitt Direttiva individwali fis-sens tal-Artikolu 16(1) tad-Direttiva tal-Kunsill 89/391/KEE) (ĠU L 158, 30.4.2004, p. 50).

Appendiċi 6

KEJL TAL-VITELLOĠENINA

Il-kejl tal-vitelloġenina (VTG) isir bl-użu ta' metodu ta' assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiku (ELISA) li oriġinarjament ġie żviluppat għall-VTG tal-karpjun buras (Parks *et al*., 1999). Bħalissa, ma hemm ebda antikorp kummerċjalment disponibbli għal *X. laevis*. Madankollu, fid-dawl tal-firxa kbira ta' informazzjoni għal din il-proteina u d-disponibbiltà tas-servizzi ta' produzzjoni kummerċjali kosteffikaċi tal-antikorpi, hu raġonevoli li l-laboratorji faċilment ikunu jistgħu jiżviluppaw ELISA biex jagħmlu dan il-kejl (Olmstead *et al*., 2009). Barra minn hekk, Olmstead *et al*. (2009) jipprovdu wkoll deskrizzjoni tal-assaġġ kif modifikat għall-VTG f'*X. tropicalis*, kif muri hawn taħt. Il-metodu juża antikorp magħmul kontra l-VTG ta' *X. tropicalis*, iżda hu magħruf ukoll li jaħdem għall-VTG ta' *X. laevis*. Ta' min jinnota li jistgħu jintużaw ELISAs mhux kompetittivi wkoll, u li dawn jista' jkollhom limiti ta' detezzjoni inferjuri mill-metodu deskritt hawn taħt.

Materjali u reaġenti

— Serum tal-ewwel antikorp (Ab) preassorbit

— Ħallat parti (1) serum tal-1el Ab tal-VTG anti-*X. tropicalis* ma' 2 partijiet plażma tal-irġiel tal-kontroll u ħalli f'RT għal ~ 75 minuta, itfa' fuq is-silġ għal 30 min, iċċentrifuga > 20K x G għal siegħa (1) f'4 °C, neħħi s-supernatant, l-alikwota, u aħżen f'-20 °C.

— It-2ni Antikorp

— Konjugat tal-IgG-HRP tal-Mogħoż Kontra l-Fniek (eż., Bio-Rad 172-1019)

— Standard tal-VTG

— VTG purifikata ta' *X. laevis* fi 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5' Tetrametil-benżidina) (eż., KPL 50-76-00; jew Sigma T0440)

— Serum Normali tal-Mogħoż (NGS)(eż., Chemicon® S26-100ml)

— Pjastri għall-mikrotitraġġ tal-polistiren tal-EIA b'96 bwejra (eż., ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— form tal-ibridazzjoni ta' 37 °C (jew inkubatur tal-arja b'ekwilibrazzjoni veloċi) għall-pjastri, banjumarija għat-tubi

— Tagħmir, sustanzi kimiċi u provvisti komuni oħra tal-laboratorju.

Riċetti

Bafer tal-Kisi (50 mM Bafer tal-Karbonat, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
ilma	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfat, 1,5 M NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
ilma	810 ml

Bafer tal-Ħasil (PBST):

10X PBS	100 ml
ilma	900 ml

Aġġusta l-pH għal 7,3 b'1 M HCl, imbagħad żid 0,5 ml Tween-20

Bafer tal-Assaġġ:

Serum Normali tal-Mogħoż (NGS)	3,75 ml
Bafer tal-Ħasil	146,25 ml

Ġbir tal-kampjuni

Id-demm jinġabar b'tubu mikroermatokrit eparinizzat u jitqiegħed fuq is-silġ. Wara ċ-ċentrifugazzjoni għal 3 minuti, it-tubu jingħata punteġġ, jinkiser biex jinfetaħ, u l-plażma tinħeles f'0,6 ml tubi mikroċentrifugi li jkun fihom 0,13 unitajiet ta' aprotinina lijofilizzata. (Dawn it-tubi jitħejjew minn qabel billi jiżdied l-ammont xieraq ta' aprotinina, iffriżar u lijofilizzazzjoni fi speed-vac bi sħana baxxa sakemm jinxfu.) Aħżen il-plażma f'-80 °C sakemm tiġi analizzata.

Proċedura għal pjastra waħda

Kisi tal-pjastra

Ħallat 20 µl VTG purifikata ma' 22 ml bafer karbonat (3 µg/ml finali). Żid 200 µl ma' kull bwejra ta' pjastra b'96 bwejra. Għatti l-pjastra b'rita adeżiva tal-issiġillar u ħalliha tinkuba f'37 °C għal sagħtejn (jew 4 °C matul il-lejl).

Imblokkar tal-pjastra

Is-soluzzjoni tal-imlokkar titħejja billi jiżdiedu 2 ml Serum Normali tal-Mogħoż (NGS) ma' 38 ml bafer tal-karbonat. Neħħi s-soluzzjoni tal-kisi u xxotta bit-tħawwid. Żid 350 µl tas-soluzzjoni tal-imblokkar f'kull bwejra.. Għatti b'rita adeżiva tal-issiġillar u inkuba f'37 °C għal sagħtejn (jew f'4 °C matul il-lejl).

Tħejjija tal-istandards

5,8 µl standard tal-VTG purifikata jitħallat ma' 1,5 ml bafer tal-assaġġ f'tubu tat-test tal-ħġieġ li jintrema tal-borosilikat ta' 12 x 75 mm. Dan irendi 12 760 ng/ml. Imbagħad issir dilwizzjoni serjali billi jiżdiedu 750 µl tad-dilwizzjoni preċedenti ma' 750 µl bafer tal-assaġġ biex jinkisbu konċentrazzjonijiet finali ta' 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100, u 50 ng/ml.

Tħejjija tal-Kampjuni

Ibda b'dilwizzjoni ta' 1:300 (eż., għaqqad 1 µl plażma ma' 299 µl bafer tal-assaġġ) jew ta' 1:30 tal-plażma fil-bafer tal-assaġġ. Jekk ikun mistenni ammont kbir ta' VTG, jistgħu jkunu meħtieġa dilwizzjonijiet addizzjonali jew akbar. Ipprova żomm il-B/B_o fi ħdan il-medda tal-istandards. Għal kampjuni mingħajr VTG apprezzabbli, eż., irġiel u nisa tal-kontroll (li lkoll ikunu immaturi), uża d-dilwizzjoni ta' 1:30. Kampjuni dilwiti anqas minn hekk jistgħu juru effetti matriċi mhux mixtieqa.

Barra minn hekk, hu rakkomandat li tagħmel kampjun ta' kontroll pożittiv f'kull pjastra. Dan jiġi minn grupp ta' plażma li jkun fih livelli indotti għolja ta' VTG. Il-grupp għall-ewwel jiġi dilwit f'NGS, jiġi diviż f'alikwoti u jinħażen f'-80 C. Għal kull pjastra, alikwota titħalla tinħall, tiġi dilwita aktar f'bafer tal-assaġġ u tintuża b'mod simili għal kampjun tat-test.

Inkubazzjoni bl-1el antikorp

L-1el Ab jitħejja billi ssir dilwizzjoni ta' 1:2000 serum preassorbit tal-1el Ab f'bafer tal-assaġġ (eż., 8 µl għal 16 ml bafer tal-assaġġ). Għaqqad 3008 µl tas-soluzzjoni tal-1el Ab ma' 300 µl tal-kampjun/tal-istandard f'tubu tal-ħġieġ. It-tubu B_o jitħejja b'mod simili bi 300 µl bafer tal-assaġġ u bi 300 µl antikorp. Barra minn hekk, għandu jitħejja tubu NSB bl-użu ta' 600 µl bafer tal-assaġġ biss, jiġifieri ebda Ab. Għatti t-tubi b'Parafilm u vvortifikahom bil-galbu biex jitħalltu. Inkubahom f'banjumarija ta' 37 °C għal siegħa (1).

Ħasil tal-pjastra

Eżatt qabel ma titlesta l-inkubazzjoni tal-1el Ab, aħsel il-pjastra. Tagħmel dan billi tħawwad il-kontenuti u tixxotta bit-taptip fuq karta assorbenti. Imbagħad imla l-bwejriet bi 350 µl soluzzjoni tal-ħasil, tbattal u tixxotta bit-taptip. Pipetta ripetitur b'diversi kanali jew ħassiel tal-pjastri jkunu siewja hawnhekk. L-istadju tal-ħasil jiġi ripetut darbtejn oħra għal total ta' tliet ħasliet.

Tgħabbija tal-pjastra

Wara li l-pjastra tkun maħsula, neħħi t-tubi mill-banjumarija u vvortifikahom bil-galbu. Żid 200 µl minn kull kampjun, mill-istandard, mill-B_o, u mit-tubu tal-NSB fil-bwejriet duplikati tal-pjastra. Għatti l-pjastra b'rita adeżiva tal-issiġillar u ħalliha tinkuba għal siegħa (1) f'37 °C.

Inkubazzjoni bit-2ni antikorp

Fi tmiem l-inkubazzjoni mill-istadju preċedenti, il-pjastra għandha tinħasel tliet darbiet mill-ġdid, bħalma ntqal hawn fuq. It-2ni Ab dilwit jitħejja bit-taħlit ta' 2,5 µl tat-2ni Ab ma' 50 ml bafer tal-assaġġ. Żid 200 µl tat-2ni Ab dilwit f'kull bwejra, issiġilla bħalma ntqal aktar 'il fuq, u inkuba għal siegħa (1) f'37 °C.

Żieda tas-substrat

Wara li titlesta l-inkubazzjoni bit-2ni Ab, aħsel il-pjastra tliet darbiet kif deskritt aktar 'il fuq. Imbagħad żid 100 µl substrat tat-TMB f'kull bwejra. Ħalli r-reazzjoni tipproċedi għal 10 minuti, idealment protetta minn dawl qawwi. Waqqaf ir-reazzjoni billi żżid 100 µl ta' aċidu fosforiku 1 M. Dan ibiddel il-kulur minn blu għal isfar intens. Kejjel l-assorbanza f'450 nm billi tuża apparat li jkejjel il-pjastri.

Ikkalkola l-B/Bo

Naqqas il-valur medju tal-NSB mill-kejlijiet kollha. Il-B/B_o għal kull kampjun u għall-istandard jiġi kkalkolat bid-diviżjoni tal-valur tal-assorbanza (B) bl-assorbanza medja tal-kampjun tal-B_o.

Ikseb il-kurva standard u ddetermina l-ammonti mhux magħrufa

Iġġenera kurva standard bl-għajnuna ta' xi softwer tal-grafika bil-kompjuter (eż., Slidewrite™ jew Sigma Plot®) li jestrapola l-kwantità mill-B/B_o ta' kampjun fuq il-bażi tal-B/B_o tal-istandards. Tipikament, l-ammont jiġi plottjat fuq skala tal-log u l-kurva jkollha forma sigmojde. Madankollu, jista' jidher lineari meta tintuża medda ristretta ta' standards. Ikkoreġi l-ammonti tal-kampjun għall-fattur ta' dilwizzjoni u rrapporta bħala VTG mg/ml tal-plażma.

Determinazzjoni tal-limiti minimi ta' detezzjoni (MDL)

Spiss, b'mod partikolari f'irġiel normali, mhux se jkun ċar kif tirrapporta r-riżultati minn valuri baxxi. F'dawn il-każijiet, għandhom jintużaw il-Limiti ta' kunfidenza ta' 95 % biex jiġi determinat jekk il-valur għandux jiġi rapportat bħala żero jew xi numru ieħor. Jekk ir-riżultat tal-kampjun ikun fi ħdan l-intervall ta' kunfidenza tal-istandard żero (B_0), ir-riżultat għandu jkun rapportat bħala żero. Il-livell minimu ta' detezzjoni se jkun l-anqas standard li jkun konsistentement differenti mill-istandard żero; jiġifieri, iż-żewġ intervalli ta' kunfidenza ma jidħlux f'xulxin. Għal kwalunkwe riżultat tal-kampjun li jkun fi ħdan il-limitu ta' kunfidenza tal-livell minimu ta' detezzjoni, jew ogħla, jiġi rapportat il-valur ikkalkolat. Jekk kampjun jaqa' bejn l-istandard żero u l-intervalli ta' kunfidenza tal-livell minimu ta' detezzjoni, nofs il-livell minimu ta' detezzjoni għandu jiġi rapportat għall-valur ta' dak il-kampjun.

DOKUMENTAZZJONI

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Appendiċi 7

ANALIŻI STATISTIKA

Il-LAGDA jiġġenera tliet forom ta' *data* li jridu jiġu analizzati statistikament: (1) *Data* kontinwa kwantitattiva, (2) *Data* dwar iż-żmien sal-avveniment għar-rati ta' żvilupp (Żmien sal-istadju 62 ta' NF) u (3) *Data* ordinali fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew tal-istadji tal-iżvilupp mill-evalwazzjonijiet tal-istopatoloġija. Is-siġra deċiżjonali tal-analiżi statistika rakkomandata għal-LAGDA hi murija fil-Figura 1. Barra minn hekk, ċerti annotazzjonijiet li jaf ikunu meħtieġa biex issir analiżi statistika għall-kejlijiet mil-LAGDA huma indikati hawn taħt. Għas-siġra deċiżjonali ta' analiżi, ir-riżultati tal-kejlijiet għall-mortalità, għat-tkabbir (piż u tul) u għall-indiċi somatiku tal-fwied (LSI) għandhom jiġu analizzati skont il-fergħa Punti ta' tmiem oħra.

***Data** kontinwa*

Id-*data* għall-punti ta' tmiem kontinwi l-ewwel għandha tiġi verifikata għall-monotoniċità bit-trasformazzjoni tal-klassifikazzjoni tad-*data*, bit-tidħil f'mudell ANOVA u bit-tqabbil tal-kuntrasti lineari u kwadratiċi. Jekk id-*data* tkun monotonika, test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra għandu jsir fuq il-medjani tar-repliki u ma għandha tiġi applikata ebda analiżi sussegwenti. Alternattiva għad-*data* li normalment tiġi distribwita b'varjanzi omoġeni hi t-test ta' tendenza rigressiva ta' Williams. Jekk id-*data* ma tkunx monotonika (kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u lineari ma jkunx sinifikanti), din għandha tiġi analizzata bl-użu ta' mudell ANOVA b'effetti mħallta. Imbagħad id-*data* għandha tiġi vvalutata għan-normalità (idealment bl-użu tat-test ta' Shapiro-Wilk jew ta' Anderson-Darling) u għall-omoġenità tal-varjanza (idealment bl-użu tat-test ta' Levene). Iż-żewġ testijiet isiru fuq ir-residwi mill-mudell ANOVA b'effetti mħallta. Jista' jintuża ġudizzju espert minflok dawn it-testijiet formali għan-normalità u għall-omoġenità tal-varjanza, għalkemm it-testijiet formali huma ppreferuti. Jekk id-*data* jkollha distribuzzjoni normali bil-varjanza omoġena, is-suppożizzjonijiet ta' ANOVA b'effett imħallat ikunu ssodisfati u jiġi determinat trattament sinifikanti mit-test ta' Dunnett. Meta tinstab nonnormalità jew eteroġenità tal-varjanza, is-suppożizzjonijiet tat-test ta' Dunnett ikunu nkisru u titfittex transform stabbilizzanti normalizzati tal-varjanza. Jekk ma jinstab ebda transform, effett ta' trattament sinifikanti jiġi determinat b'test ta' Dunn. Kull meta jkun possibbli, għandu jsir test b'denb wieħed għall-kuntrarju ta' test b'żewġt idnub, iżda jkun hemm bżonn ta' ġudizzju espert biex jiġi determinat liem hu xieraq għal punt ta' tmiem partikolari.

Mortalità

Id-*data* dwar il-mortalità għandha tiġi analizzata għall-perjodu ta' żmien li jkopri t-test sħiħ u għandha tiġi espressa bħala proporzjon li jkun miet fi kwalunkwe tank partikolari. Imrieżeb li ma jlestux il-metamorfożi fil-perjodu ta' żmien partikolari, dawk l-imrieżeb li jkunu fil-koorta tas-subkampjun tal-larva, dawk iż-żrinġijiet li jkunu għadhom qed jikbru li jinqatlu, u kwalunkwe annimal li jmut minħabba errur min-naħa tal-esperimentatur għandhom jiġu trattati bħala *data* ċensurata u ma jiddaħħlux fid-denominatur tal-kalkolu perċentwali. Qabel kwalunkwe analiżi statistika, il-proporzjonijiet tal-mortalità għandhom jiġu trasformati bl-għerq kwadrat arcsin. Alternattiva hi li jintuża t-test ta' tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage, possibilment b'aġġustament ta' Rao-Scott fil-preżenza ta' dispersjoni eċċessiva.

Piż u tul (data dwar it-tkabbir)

L-irġiel u n-nisa ma jkunux sesswalment dimorfiċi matul il-metamorfożi u b'hekk id-*data* dwar it-tkabbir tas-subkampjunar tal-larva għandha tiġi analizzata b'mod indipendenti mill-ġeneru. Madankollu, id-*data* dwar it-tkabbir tal-annimali żgħar li jkunu għadhom qed jikbru għandha tiġi analizzata b'mod separat fuq il-bażi tas-sess ġenetiku. Trasformazzjoni tal-log tista' tkun meħtieġa għal dawn il-punti ta' tmiem peress li n-normalità tal-log tad-*data* dwar id-daqs mhix rari.

Indiċi somatiku tal-fwied (LSI)

Il-piżijiet tal-fwied għandhom jiġu normalizzati bħala proporzjonijiet tal-piżijiet tal-ġisem sħiħ (jiġifieri LSI) u jiġu analizzati b'mod separat fuq il-bażi tas-sess ġenetiku.

Żmien għall-istadju 62 ta' NF

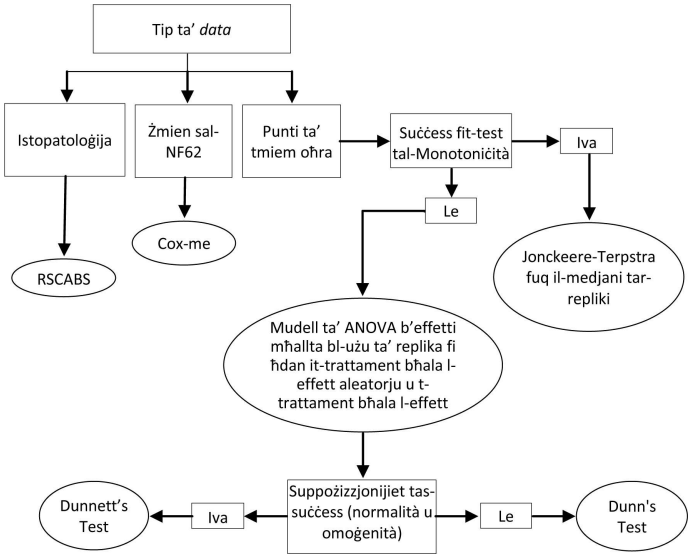
Id-*data* dwar iż-żmien għall-metamorfosi għandha tiġi trattata bħala *data* dwar iż-żmien sa avveniment, bi kwalunkwe mortalità jew individwu li ma jilħaqx l-istadju 62 ta' NF f'70 jum li jiġu trattati bħala *data* right-censored (jiġifieri l-valur veru jkun akbar minn 70 jum iżda l-istudju jintemm qabel ma l-annimal ikun laħaq l-istadju 62 ta' NF f'70 jum). Iż-żmien medja sat-tlestija tal-istadju 62 ta' NF tal-metamorfosi fil-kontrolli tal-ilma ta' dilwizzjoni għandu jintuża biex tiġi determinata d-data ta' terminazzjoni tat-test. Iż-żmien medjan sat-tlestija tal-metamorfosi jista' jiġi determinat bi stimaturi tal-limitu tal-prodott ta' Kaplan-Meier. Dan il-punt ta' tmiem għandu jiġi analizzat bl-użu ta' mudell tal-periklu proporzjonali ta' Cox b'effetti mħallta li jqis l-istruttura tar-repliki tal-istudju.

Id-*data* dwar l-istopatoloġija (punteġġi tas-severità u stadji tal-iżvilupp)

Id-*data* dwar l-istopatoloġija tkun fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew ta' stadji tal-iżvilupp. Test imsejjaħ RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) juża test ta' tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage aġġustat skont Rao-Scott f'kull livell ta' severità f'rispons tal-istopatoloġija (Green *et al.*, 2014). L-aġġustament ta' Rao-Scott jinkorpora d-disinn sperimentali tar-reċipjent tar-replika fit-test. Il-proċedura by Slices tinkorpora l-aspettattiva bijoloġika li s-severità tal-effett għandha tendenza li tiżdied hekk kif jiżdiedu d-doži jew il-konċentrazzjonijiet, filwaqt li jinżammu l-punteġġi tas-suġġetti individwali u tinstab is-severità ta' kwalunkwe effett misjub. Il-proċedura RSCABS ma tiddeterminax biss liema trattamenti jkunu statistikament differenti mill-kontrolli (jiġifieri jkollhom patoloġija aktar severa mill-kontrolli), iżda tiddetermina wkoll f'liema punteġġ tas-severità sseħħ id-differenza u b'hekk tipprovdi kuntest ferm meħtieġ għall-analiżi. Fil-każ tal-għażla tal-istadji tal-iżvilupp tal-gonadi u tal-kanali riproduttivi, għandha tiġi applikata manipolazzjoni addizzjonali għad-*data* peress li suppożizzjoni tal-RSCABS hi li s-severità tal-effett tiżdied mad-doża. L-effett osservat jista' jdewwem jew iħaffef l-iżvilupp. Għaldaqstant, id-*data* dwar l-għażla tal-istadji tal-iżvilupp għandha tiġi analizzata kif rapportata biex tiġi individwata aċċelerazzjoni fl-iżvilupp u mbagħad tiġi invertita manwalment qabel ma ssir it-tieni analiżi biex jiġi individwat dewmien fl-iżvilupp.

Figura 1

Siġra deċiżjonali tal-analiżi statistika għad-*data* tal-LAGDA.



DOKUMENTAZZJONI

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108-1 116.

Appendiċi 8

KUNSIDERAZZJONIJIET GĦAT-TRAĊĊAR U GĦALL-MINIMIZZAZZJONI TAL-OKKORRENZA TA SKOLJOŻI

Skoljoži idjopatika, li normalment tidher bħala denb mgħawweġ f'imrieżeb tal-*Xenopus laevis*, tista tikkomplika l-osservazzjonijiet morfoloġiċi u tal-imġiba fil-popolazzjonijiet tat-test. Għandhom jitwettqu sforzi biex tiġi minimizzata jew eliminata l-inċidenza ta' skoljoži, kemm fl-istokk kif ukoll fil-kundizzjonijiet tat-test. Fit-test definittiv, hu rakkomandat li l-prevalenza ta' skoljoži moderata u severa tkun anqas minn 10 % biex titjieb il-kunfdenza li t-test ikun jista jindividwa effetti fuq l-iżvilupp relatati mat-trattament f'larva tal-anfibji li mill-bqija jkunu f'saħħithom.

Osservazzjonijiet ta' kuljum matul it-test definittiv għandhom jirreġistraw kemm l-inċidenza (għadd tal-individwi) kif ukoll is-severità tal-iskoljoži, meta tkun preżenti. In-natura tal-anormalità għandha tiġi deskritta fir-rigward tal-post (*eż.*, quddiem jew wara l-bokka) u tad-direzzjoni tal-kurvatura (*eż.* latreali jew dorsali għal ventrali). Is-severità tista tiġi gradata kif ġej:

(NR) Mhux rimarkabbli: ebda kurvatura preżenti

(1) Minima: kurvatura laterali ħafifa wara l-bokka; tidher biss waqt il-mistrieħ

(2) Moderata: kurvatura laterali wara l-bokka; viżibbli l-ħin kollu iżda ma tinibixxix il-moviment

(3) Severa:: kurvatura laterali quddiem il-bokka; JEW kwalunkwe kurvatura li tinibixxi l-moviment; JEW kwalunkwe kurvatura dorsali għal ventrali

Il-Bord Xjentifiku Konsultattiv tal- US EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) irrieżamina *data* sommarju għall-iskoljoži fi ħmistax-il Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Anfibji b'X. *laevis* (stadju 51 sa 60+ ta' NF) u pprovda rakkomandazzjonijiet ġenerali għat-tnaqqis tal-prevalenza ta' din l-anormalità fil-popolazzjonijiet tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet huma rilevanti għal-LAGDA anki jekk dan it-test jinkludi perjodu ta' żmien tal-iżvilupp itwal.

Prestazzjoni Storika tar-Riproduzzjoni

Ġeneralment, adulti f'saħħithom ta' kwalità għolja għandhom jintużaw bħala pari tat-tgħammir; l-eliminazzjoni ta' pari tat-tgħammir li jipproduċu wlied bl-iskoljoži tista' timminimizza l-okkorrenza tagħha maż-żmien. Speċifikament, il-minimizzazzjoni tal-użu ta' stokk tat-tnissil maqbud fis-selvaġġ tista' tkun ta' benefiċċju. Il-perjodu ta' esponiment tal-LAGDA jibda b'embrijuni tal-istadju 8 sa 10 ta' NF, u mhuwiex fattibbli li jiġi determinat sa mill-bidu tat-test jekk l-individwi partikolari hux se jesibixxu skoljoži. B'hekk, minbarra t-traċċar tal-inċidenza ta' skoljoži f'annimali ttestjati, għandha tiġi dokumentata l-prestazzjoni storika tal-klaċċ (inkluża l-prevalenza tal-iskoljoži fi kwalunkwe larva li titħalla tiżviluppa). Jista' jkun siewi li tkompli tiġi ssorveljata l-parti ta' kull klaċċ li ma tintużax fi studju partikolari u li dawn l-osservazzjonijiet jiġu rapportati (FIFRA SAP 2013).

Kwalità tal-Ilma

Importanti li tiġi żgurata kwalità adegwata tal-ilma, kemm fl-istokk tal-laboratorju kif ukoll matul it-test. Minbarra l-kriterji tal-kwalità tal-ilma evalwati bħala rutina għal testijiet tat-tossiċità akkwatika, jista' jkun utli li jsiru monitoraġġ u korrezzjoni għal kwalunkwe insuffiċjenza ta' nutrijenti (*eż.*, insuffiċjenza ta' vitamina Ċ, ta' kalċju, ta' fosfru) jew livelli eċċessivi ta' selenju u ta' ram, li huma rapportati li jikkawżaw skoljoži sa gradi varji f'*Rana* sp. u fi *Xenopus* sp. imrobbija fil-laboratorju (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; kif rapportat fil-FIFRA SAP 2013). L-użu ta' reġimen xieraq tad-dieta (ara l-Appendiċi 4), u t-tindif regolari tat-tank, ser itejbu b'mod ġenerali l-kwalità tal-ilma u s-saħħa tal-eżemplari tat-test.

DIETA

Rakkomandazzjonijiet speċifiċi għal reġimen djetetiku, li nstab li rnexxew fil-LAGDA, huma spjegati fl-Appendiċi 4. Hu rakkomandat li s-sorsi tat-tagħlif jiġu skrinjati għal tossini bijoloġiċi, għal erbiċidi, u għal pestiċidi oħra li huma maħrufa li jikkawżaw skoljożi f'*X. laevis* jew f'annimali akkwatiċi oħra (Schlenk u Jenkins 2013). Pereżempju, l-esponiment għal ċerti inibituri tal-kolinesteraži ġie assoċjat mal-iskoljożi fil-ħut (Schultz *et al.* 1985) u żrinġijiet (Bacchetta *et al.* 2008).

DOKUMENTAZZJONI

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, u G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, u R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, u J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, u D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, u P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., u Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. Minuti tal-US EPA FIFRA SAP Nru 2013-03. 21-23 ta' Mejju 2013. Washington, DC.