31988L0302

30.5.1988 *IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ* L 133/1

ID-DIRETTIVA TAL-KUMMISSJONI

tat-18 ta' Novembru 1987

li taddatta għall-progres tekniku għad-disa' 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 perikoluż

(88/302/KEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jistabbilixxi l-Komunità Ekonomika Ewropea,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE tas-27 ta' Ġunju 1967 dwar l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikoluż [1], kif emendata għas-sitt darba bid-Direttiva 79/831/KEE [2], u partikolarment l-Artikolu 19 tagħha,

Billi l-Artikolu 3(1) tad-Direttiva 67/548/KEE jipprovdi li l-propjetajiet fiżiko-kimiċi, it-tossiċità u l-ekotossiċità ta' sustanzi u preparazzjonijiet għandhom ikunu ddeterminati skond il-metodi speċifikati fl-Anness V;

Billi l-Artikolu 3(2) tad-Direttiva 67/548/KEE jipprovdi li l-periklu ambjentali veru jew potenzjali ta' sustanza jew preparazzjoni għandu jkun stmat skond il-karatteristiċi stabbiliti fl-Annessi VII u VIII;

Billi l-Anness V tal-verżjoni introdotta bid-Direttiva tal-Kummissjoni 84/449/KEE [3] preżentament fih biss dawk il-metodi tat-testijiet li jikkorrispondu għall-karatteristiċi dettaljati fl-Anness VII u li huwa meħtieġ ukoll li jkunu disponibbli metodi tat-testijiet li jikkorripondu għall-karatteristiċi dettaljati fl-Anness VIII;

Billi l-miżuri li tipprovdi għalihom din id-Direttiva huma skond l-opinjoni tal-Kumitat għall-Adattament mal-Progress Tekniku tad-Direttivi dwar it-Tneħħija ta' Barrieri Tekniċi għall-Kummerċ fis-Sustanzi u l-Preparazzjonijiet Perikoluż,

ADOTTAT DIN ID-DIRETTIVA:

Artikolu 1

It-test ta' l-Anness ta' din id-Direttiva huwa miżjud ma' l-Anness V tad-Direttiva 67/548/KEE.

Artikolu 2

L-Istati Membri għandhom jadottaw u jippubblikaw qabel il-31 ta' Diċembru 1988 il-miżuri meħtieġa sabiex ikunu konformi ma' din id-Direttiva,u għandhom minnufih jgħarrfu bihom lill-Kummissjoni. Huma għandhom japplikaw dawk il-miżuri mhux iktar tard mit-30 ta' Ġunju 1989.

Artikolu 3

Din id-Direttiva hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fit-18 ta' Novembru 1987.

Għall-Kummissjoni

Stanley CLINTON DAVIS

Membru tal-Kummissjoni

---

[1] ĠU C 196, tas-16.8.1967, p. 1/67.
[2] ĠU L 259, tal-15.10.1979, p. 10.
[3] ĠU L 251, tad-19.9.1984, p. 1.

ANNESS

Il-metodi ta' prova deskritti hawnhekk huma għad-determinazzjoni ta' ċerti propjetajiet tossikoloġiċi u ekotossikoloġiċi elenkati fl-Anness VIII tad-Direttiva tal-Kunsill 79/831/KEE. Huma deskritti metodi tal-prova tajbin fil-livell 1 u l-livell 2 ta' l-Anness VIII, imma l-provi m'humiex suddiviżi bħala funzjoni tal-livelli differenti

CONTENTS

	Page
PART B: Methods for the determination of toxicity	4
General Introduction: Part B	4
Sub-chronic oral toxicity test: 90-day repeated oral dose using rodent species	8
Sub-chronic oral toxicity test: 90-day repeated oral dose using non-rodent species	12
Sub-chronic dermal toxicity study: 90-day repeated dermal dose study using rodent species	16
Sub-chronic inhalation toxicity study: 90-day repeated inhalation dose study using rodent species	20
Teratogenicity test — rodent and non-rodent	24
Chronic toxicity test	27
Carcinogenicity test	32
Combined chronic toxicity/carcinogenicity test	37
One-generation reproduction toxicity test	43
Two-generation reproduction toxicity test	47
Toxicokinetics	51
Mutagenicity testing and screening for carcinogenicity:	55
— Gene mutation — *Saccharomyces cerevisiae*	55
— Mitotic recombination — *Saccharomyces cerevisiae*	58
— *In vitro* mammalian cell gene mutation test	61
— DNA damage and repair — unscheduled DNA synthesis — mammalian cells *in vitro*	64
— Sister chromatid exchange assay *in vitro*	68
— Sex-linked recessive lethal test in *Drosophila melanogaster*	*71*
— *In vitro* mammalian cell transformation tests	73
— Rodent dominant lethal test	76
— *In vivo* mammalian germ-cell cytogenetics	79
— Mouse spot test	82
— Mouse heritable translocation	85
PART C: Methods for the determination of ecotoxicity	88
General Introduction: Part C	88
Algal inhibition test	89
Toxicity for earthworms: Artificial soil test	95
Biodegradation: Zahn — Wellens test	99
Biodegradation: Activated sludge simulation tests	106
Biodegradation: Activated sludge respiration inhibition test	118
Biodegradation: Modified SCAS test	123

PARTI B: METODI GĦAD-DETERMINAZZJONI TAT-TOSSIĊITÀ

INTRODUZZJONI ĠENERALI: PARTI B

STUDJI FIT-TUL TA' ŻMIEN

Studji kroniċi, subkroniċi u tal-kanċerogenesi

Il-karatterizzazzjoni tas-sustanza eżaminata u tat-taħlita użata għat-trattament

Il-kompożizzjoni tas-sustanza eżaminata, inkluż l-impuritajiet prinċipali u l-proprjetajiet fiżiko-kimiċi rilevanti, flimkien ma'l-istabilità, għandha tkun osservata qabel il-bidu ta' kwalunkwe studju ta' tossiċità.

Il-proprjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza eżaminata jipprovdu nformazzjoni mportanti sabiex jintgħażel il-mod kif għandha tkun somministrata, il-proġettazzjoni ta' l-istudji subkroniċi, kroniċi u kanċeroġenesi kif ukoll it-trattament u l-konservazzjoni tas-sustanza eżaminata.

L-informazzjoni dwar l-istruttura kimika u l-proprjetajiet fiżiko-kimiċi jistgħu jipprovdu indikazzjoni dwar il-karatteristiċi ta' l-assorbiment mill-mod ta' somministrazzjoni prevista u l-possibbilitatjiet metaboliċi u d-distribuzzjoni tat-tessuti. Jista' jagħti l-każ li jkun hemm informazzjoni dwar il-parametri tossikokinetiċi li jirriżultaw minn studji dwar it-tossiċità u tossikokinetiċi preċedenti.

L-elaborazzjoni ta' xi metodu analitiku għad-determinazzjoni kwalitativa u kwantitativa tas-sustanza eżaminata (inkluża l-impurità ta' mportanza kbira meta huwa possibbli) fil-mezz tad-dożaġġ u fil-materjal bijoloġiku għandhom isiru qabel il-bidu ta' kull studju.

Annimali tal-laboratorju: għażla ta' l-ispeċji u razez

Peress illi huwa neċessarju li t-trattament ta' l-annimali jestendi għall-parti l-kbira minn ħajjithom, l-istudji huma nklinati li jkunu limitati għall-ispeċji sperimentali li jgħixu ftit u li l-mantentiment tagħhom huwa faċli. Huwa verament mixtieq illi ssir magħrufa l-inċidenza ta' patoloġiji spontaneji u ta' tumuri fuq ir-razez ta' l-annimali użati meta dawn huma miżmuma f'kondizzjonijiet analoġi.

Ir-razez għandhom ikunu karatterizzati tajjeb u mingħajr ebda difett konġenitali li jista' jintervjeni. L-użu ta razez miksuba minn akkoppjamenti bejn razes ta' l-istess demm jew ta' ibridi tat-tip F1 jirrappreżentaw ċertu vantaġġi f'dan ir-rigward; iżda fejn huma disponibbli dati tal-bażi sufficjenti dwar razez li mhumiex ta' l-istess demm, fejn huma użati annimali ta' kolonji magħluqa, dawn ta' l-aħħar huma aċċettabbli.

Il-kura ta' l-annimali, dieta u provvista ta' l-ilma

L-eżamijiet u l-istudji fuq l-annimali għandhom isiru skond ir-regolamenti nazzjonali u għandhom jieħdu kont tal-prinċipji umanitarji u ta' l-iżviluppi internazzjonali fis-settur tal-benesseri ta' l-annimali.

Sabiex ikunu miksuba riżultati tajba, huwa neċessarju l-kontroll bir-reqqa tal-kondizzjonijiet ambjentali kif ukoll it-teknika adegwata tal-kura ta' l-annimali. Fatturi bħall-kondizzjonijiet ta' akkomodazzjoni, mard interkorrenti, it-terapija permezz ta' farmaċi, l-impuritajiet fid-dieta, l-arja, l-ilma, il-friex u l-kura ta' l-annimali in ġenerali jistgħu jinfluwixxu b'mod sinjifikanti fuq ir-riżultat ta' l-istudju b'dożi ripetuti. In ġenerali, l-effetti ta' l-isterilizzanti kimiċi fuq l-istudju għandhom ikunu osservati.

Id-dieta għandha tissoddisfa r-rekwiziti sustanzjużi kollha ta' l-ispecji eżaminata u għandha tkun mingħajr ebda impurità li tista' tinfluwenza r-rżzultat ta' l-istudju. L-annimali gerriema għandhom ikunu mitmugħa u moqħtija x'jixorbu ad libitum b'ikel li jkun mibdul mill-inqas kull ġimgħa. Fil-preżent, jeżistu tlett tipi ta' dieti li huma utilizzati: konvenzjonali, sintetiċi u dieti varji ta' formula miftuħa.

F'kwalunkwe dieta li tkun magħżula, il-forniturі għandhom ikunu ċerti permezz ta' kontrolli perjodiċi dwar il-valur nutrittv u l-livell ta' kontaminanti fid-dieta bażilari u jipprovdu din l-informazzjoni lill-laboratorju ma kull furnata ikel. Huwa verament mixtieq li jkunu magħrufa l-effetti ta' reġim djetetiċi fuq il-metaboliżmu kif ukoll l-iżvilupp tat-tumuri u l-għixien twil ta' l-annimali.

Barra minn hekk, l-analiżi tal-kontrolli tad-dieta bażilari jistgħu isiru mill-laboratorju li jagħmel il-provi kemm għal dawk il-komponenti ta' l-ikel, kif ukoll għal dawk il-kontaminati nvolontarji li jinkludu l-kanċerogenesi. F'dan il-każ, ir-riżultati ta' l-analiżi għandhom ikunu miżmuma u rikluži fir-rapport finali dwar kull sustanza studjata.

Il-kostitwenti djetetiċi komuni li huma magħrufa jinfluwenzaw il-kanċerogenità (ez: anti-ossidanti, aċidi grassi li mhumiex saturati, elenju) m'għandhomx ikunu preżenti f'konċentrazzjonijiet interferenti. Il-potenzali ta' l-impatt ta' diversi kontaminanti djetetiċi komuni fuq il-valutazzjoni tal-kanċeroġenità jindika illi attenzjoni partikolari għandha tingħata lill-preżenza, fid-dieta, ta' fdalijiet ta' antipestiċida, ta' komponenti organo-klorwati, ta' idrokarburi poliċikliċi-aromatiċi, ta' estroġeni, ta' metall tqil, ta' nitrosammini u mikotossinu.

Meta s-sustanza sperimentata tkun somministrata fl-ilma jew fl-ikel, it-testijiet dwar l-istabbilità huma essenzali. Testijiet rigward l-omogeneità u ta' l-istabbilità magħmula tajjeb qabel l-istudji bid-doži ripetuti, għandhom ikunu użati sabiex tkun stabbilita l-frekwenza mitluba mill-preparazzjoni tad-dieta u l-kontrolli.

Meta d-dieti huma sterellizati, għandhom ikunu osservati l-effetti ta' dawn il-proċeduri fuq is-sustanza sperimentata u l-kostitwenti djetetiċi. Arranġamenti meħtieġa għandhom jitwettqu.

Matul l-ittestjar tal-karċinoġeniċità ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji ta' kontaminanti potenzali fl-ilma utilizzat. L-ilma approvat għall-konsum uman ġeneralment huwa soddisfaċenti u nformazzjoni dwar il-kompożizzjoni tiegħu għanda tkun disponibbli.

Jista' jagħti l-każ illi l-konċentrazzjoni fis-sustanza sperimentata fid-dieta tkun mibdula hekk kif l-annimali jikbru sabiex id-dħul raġjonevolment kostanti tas-sustanza sperimentata ikun miżmum skond kemm jiżen il-ġisem.

Il-valur sustanzjuż tad-dieta ta' kontroll u dik sperimentata għandu jkun kemm jista' jkun simili. Għalhekk, il-valur sustanzjuż tas-sustanza sperimentata mħallta fid-dieta għanda tkun meqjusa. L-esperjenza tissuġerixxi illi sa 5% tas-sustanza sperimentata li mhijiex nutrittiva fid-dieta mhijiex se tintervjeni b'mod sinjifikattiv fil-valur nutrittiv tad-dieta.

1. **Studji inalatori**

L-ebda prova bil-limitu hija speċifikata minħabba li ma nstabx possibbli sabiex ikun imfisser valur bil-limitu uniku ta' espożizzjoni għall-inalazzjoni.

2. **Studju ta' teratoġenesi**

Il-metodu ta' prova huwa primarjament dirett għas-somministrazzjoni orali. B'mod alternattiv, jistgħu jittieħdu rotot oħra skond il-proprjetajiet fiżiċi tas-sustanza sperimentata jew ir-rotta li x'aktarx tittieħed fl-espożizzjoni umana. F'dawn il-każijiet, il-metodu ta' prova għandu jkun adattat billi jkunu kkunsidrati l-elementi approprjati tal-metodi ta' prova ta' 28 ġurnata.

3. **Tossikokinetiċi**

Studji tossikokinetiċi jgħinu fl-interpretazzjoni u l-valutazzjoni tad-data tat-tossiċità. L-iskop ta' dawn l-istudji huwa sabiex ikunu kkjarifikati aspetti partikolari tat-tossiċita tal-kimika studjata u r-riżultati li jistgħu jgħinu fil-programmazzjoni ta' studji oħra ta' tossiċità. Mhuwiex maħsub illi f'kull każ għandhom ikunu determinati il-parametri. Is-sekwenza kompleta ta' l-istudji tossikokinetiċi (l-assorbiment, l-eskrezzjoni, id-distribuzzjoni u l-metaboliżmu) tkun neċessarja f'każijiet rari biss. Għal uħud mill-komposti jistgħu ikunu neċessarji bidliet f'din is-sekwenza jew jista' jkun suffiċjenti studju dwar doża unika.

Definizzjonijiet

Tossikokinetiċi:	l-istdju ta' l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu u l-eskrezzjoni tas-sustanza sperimentata;
Assorbiment:	il-proċess jew il-proċessi li permezz tagħhom is-sustanza somministrata tkun assorbita mill-ġisem;
Eskrezzjoni:	il-proċess jew il-proċessi li permezz tagħhom is-sustanza somministrata u/jew il-metaboliti tagħha jkunu eliminati mill-ġisem.
Distribuzzjoni:	il-proċess jew il-proċessi li permezz tagħhom is-sustanza assorbita u/jew il-metaboliti tagħha jitqassmu fl-organiżmu
Metaboliżmu:	il-proċess jew il-proċessi li permezz tagħhom is-sustanza somministrata tkun mibdula b'mod strutturali fil-ġisem permezz ta' reazzjoni enzimatika u dik li mhijiex enzimatika.

4. **Studju akut u sub-akut dwar it-tieni speċji**

L-għan ta' l-istudju dwar it-tieni speċji huwa sabiex jikkumplementa il-konklużjonijiet li jirriżultaw mill-ewwel speċji.

Fil-każ ta' studju tat-tieni speċji, il-metodu ta' prova ġja deskritt jista' jintuża jew ikun adattat għal numru iżgħar ta' annimali.

5. **Studji dwar il-fertilità**

Fil-każijiet fejn tinħass il-ħtiega li ssir prova dwar ir-riproduzzjoni fi tlett ġenerazzjonijiet, jista' jkun estiż il-metodu deskritt għall-prova dwar ir-riproduzzjoni ta' żewġ ġenerazzjonijiet sabiex jinkludi it-tielet ġenerazzjoni.

6. **Studji dwar il-mutaġenicità**

Provi supplementari tal-mutaġeniċità inkluż l-iskreening tal-kanċeroġenicità

Fl-Anness VII tad-Direttiva, studji supplimentari sabiex il-mutaġeniċità tkun investigata iktar jew il-pre-skreen tal-kanċeroġenicità huma msemmija. L-istudji msemmija f'dan il-kapitolu jistgħu b'mod ġenerali jintużaw sabiex ikunu nvestigati z-zewġ aspetti.

Introduzzjoni

L-ewwel valutazzjoni ta' l-attività mutaġenika tas-sustanza tikkonsisti fir-riċerka tal-mutazzjoni ġenika (puntiforma) fil-batterja u l-ħsara kromosomika fiċ-ċelluli tal-mammiferi (in vitro jew in vivo); il-metodi xierqa għal din is-serje ta' provi bażilari kienu msemmija qabel. Dan il-kapitolu jittratta dwar ir-riċerka supplimentari li hija neċessarja għall-verifikazzjoni jew l-estensjoni tar-riżultati miksuba matul is-serje ta' provi bażilari u li tista' tinuża għal numru ta' raġunijiet:

1. sabiex ikunu kkonfermati r-riżultati miksuba fis-serje ta' provi bażilari;

2. sabiex ikunu riċerkati eventi ġenetici li ma kienux studjati fis-serje ta' provi bażilari;

3. sabiex tibda jew tkun estiża ir-riċerka in vivo.

Għal dan il-għan il-firxa ta' provi deskritti jinkludu sistemi ewkarjotiċi kemm in vitro kif ukoll in vivo u serje ta' eventi ġenetiċi. Il-provi jipprovdu informazzjoni dwar mutazzjoni puntwali fl-organiżmi l-aktar ikkumplikati mill-batterja utilizzati fis-serje ta' provi bażilari u jwessgħu l-informazzjoni dwar il-kapaċità tas-sustanza sabiex tikkawża aberrazzjonijiet kromosomiċi.

Huma deskritti wkoll il-provi dwar l-eventi ġenetiċi li huma differenti minn mutazzjonijiet puntiformi u mill-aberazzjonijiet kromosomiċi. Dawn jipprovdu informazzjoni supplimentari u jistgħu ikunu approprjament utilizzati fl-iskemi ta' l-analiżi.

Bħala prinċipju ġenerali, meta programm ta' riċerka ulterjuri dwar il-mutaġeniċità huwa kkunsidrat, għanda tkun provduta nformazzjoni addizzjonali rilevanti dwar il-potenzal mutaġeniku u/jew kanċeroġeniku ta' dik is-sustanza.

L-istudji li jistgħu ikunu adattati għal każ speċifiku jiddependu minn numru ta' fatturi, inklużi l-karatteristiċi kemikali u fiżiċi tas-sustanza, ir-riżultati tal-provi batteroloġiċi u ċitoġenetiċi inizzjali, il-profil metaboliku tas-sustanza, ir-riżultati ta' studji tossiċi oħra, u l-użu magħruf tas-sustanza. Minħabba in-numru ta' fatturi li għandhom jitqiesu, m'huwiex approprjat li tintgħażel skema retta għall-għażla tal-provi. Madankollu, ċertu prinċipji ġenerali jistgħu iservu ta' għajnuna. Jekk prova tirriżulta pożittiva matul ir-riċerka bażilari, l-istudji supplimentari għandhom mill-inqas jinkludu prova waħda sabiex ikunu osservat l-istess eventi ġenetiċi. Jekk iż-żewġ provi tar-riċerka bażilari jirriżultaw fin-negattiv, l-istudji supplimentari għandhom jinkludu prova tal-mutazzjonijiet ġenetiċi u waħda għall-aberrazzjonijiet kromosomiċi. Jista' jkun opportun li tinkiseb data indikativa addizzjonali dwar l-effetti fuq id-DNA (imniżżla hawn taħt).

Il-metodi li għandhom ikunu segwiti għal din ir-riċerka huma mniżżla hawn taħt a bażi tal-ġenetika riżultanti prinċipali.

Studji dwar il-mutazzjoni genetika (puntiformi)

Sabiex tkun investigata aktar il-kapaċità ta' sustanza li tikkawża mutazzjonijiet ġenetici (puntiformi), waħda minn dawn il-provi segwenti tista' tkun biżżejjed:

(a) riċerka ta' mutazzjoni 'l quddiem jew lura permezz ta' l-użu ta' mikro-organiżmi ewkarijotiċi (*Saccharomyces cerevisiae*);

(b) studji in vitro għar-riċerka tal-mutazzjoni 'l quddiem f'ċelluli mammiferi;

(c) studji tar-reċessivi letali marbuta mas-sess fid-*Drosophila melanogaster*;

(d) studji in vivo tal-mutazzjonijiet fiċ-ċelluli somatiċi: prova tat-traslokazzjoni ereditarji tal-ġurdien.

Studji tal-aberrazzjonijiet kronomsomiċi

Sabiex tkun investigata aktar il-kapaċità ta' sustanza li tikkawża aberrazzjonijiet kromosomiċi, jista' jkun utilizzat wieħed mill-provi segwenti:

(a) studji ċitoġenetiċi in vivo tal-mammiferi;

Ghandha tkun inkluża l-analiżi tal-metafaži in vivo taċ-ċelluli tal-mudullun fil-każ li ma tkunx inkluża fil-valutazzjoni inizjali (serje ta' provi bażilari). Jistgħu ukoll ikunu riċerkati ċelluli ġerminali ċitoġenetiċi in vivo;

(b) Studji ċitoġenetiċi in vitro ta' ċelluli mammiferi, jekk dan ma seħħx matul il-valutazzjoni inizjali;

(c) Studji tal-letali dominanti fl-annimali gerriema

(d) prova tat-traslokazzjoni ereditarji tal-ġurdien

Esperimenti b'indikaturi għall-effetti fuq id-DNA

Jeżistu metodi li jindikaw uħud mill-effetti fuq id-DNA iżda li m'għandhomx konsegwenzi mutaġeni bħala l-event finali. Dawn l-istudji jipprovdu nformazzjoni kumplimentari għal dik miksuba mill-istudji dwar il-mutaġeniċità, li jistgħu jirriżultaw utili għall-interpretazzjoni ta' dan l-istudju. Meta tinħass il-ħtieġa, tista' tintuża waħda mill-metodi li ġejjin billi jintużaw makrorganiżmi ewkarijotiċi jew ċelluli tal-mammiferi:

(a) Rikombinazzjoni mitotika fis-Saccharomyces cerevisae;

(b) Ħsara u tiswija tad-DNA – sinteżi tad-DNA li m'hijiex programmata – fiċ-ċelulli tal-mammiferi (in vitro);

(c) Skambji ta' kromatidi aħwa fiċ-ċelulli tal-mammiferi (in vitro).

Provi oħra b'indikaturi għar-riċerka tal-potenzal tal-kanċerogenu

Jeżistu provi għar-riċerka tat-trasformazzjoni in vitro taċ-ċelluli tal-mamiferi li jkejlu il-kapaċità ta' sustanza li tikkawza bidliet morfoliġiċi u komportamentali fil-kultura taċ-ċelluli. Huwa maħsub illi dan huwa relatat mat-trasformazzjoni malinja in vivo. Għat-trasformazzjoni jistgħu jintużaw numru ta' tipi diversi ta' ċelluli u jkunu segwiti kriterji diversi.

Valutazzjoni tar-riskju ta' l-effetti li jistgħu jintirtu fil-mammiferi

Jezistu metodi sabiex jitkejjel fil-mammiferi l-effett li jista' jintiret, ikkawżat minn mutazzjoni ġenetika (puntiformi), bħal prova tal-lokazzjoni speċifika fil-gurdien [1], jew sabiex ikunu stabbiliti l-aberrazzjonijiet kromosomiċi, bħala l-prova ta' traslokazzjoni ereditarji tal-gurdien. Dawn il-metodi jistghu ikunu utilizzati meta jkun stmat ir-riskju ġenetiku possibbli tas-sustanza għall-bniedem. Madankollu, minħabba il-komplessità ta' dawn il-provi u tan-numru kbir ta' annimali neċessarji, b'mod partikolari għal dik il-prova tal-lokazzjoni speċifika, tinħtieġ ġustifikazzjoni tajba sabiex dawn il-provi jkunu esegwiti.

[1] Il-prova tal-lokazzjoni speċifika tal-gurdien (li mhijiex deskritta f'dan id-dokument) tista' tkun utilizzata sabiex tkun imkejla il-mutazzjoni ġenetika fiċ-ċelluli ġerminali fl-ewwel ġenerazzjoni, wara l-espożizzjoni għal sustanza mutaġena. Jistgħu jkunu osservati u kwantifikati il-bidliet ġenetiċi li jistgħu iwasslu għall-bidliet fil-prodotti ġenetiċi li jikkawzaw fenotipi viżibbli.

EŻAMI TA' TOSSIĊITA ORALI SUB-KRONIKU

ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻA GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊJI TA' ANNIMALI GERRIEMA

1. **METODU**

1.1 **Introduzzjoni**

Ara Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.2 **Definizzjonijiet**

Ara Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.3 **Sustanzi Riferiti**

L-ebda

1.4 **Prinċipji tal-metodu ta' l-istudju**

Is-sustanza sperimentali għanda tkun somministrata kuljum, b'mod orali, f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' annimali tal-laboratorju, doża waħda għal kull grupp għall-perjodu ta' 90 ġurnata. Matul il-perjodu ta' somministrazzjoni, l-annimali huma osservati kuljum sabiex ikunu osservati sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu matul l-istudju huma sottoposti għall-nekroskopija, u l-konklużjoni ta' l-eżami ta' dawk l-annimali li jsalvaw huma sottoposti għall-nekroskopija.

1.5 **Kriterji kwalitativi**

L-ebda

1.6 **Deskrizzjoni tal-metodu ta' l-eżami**

Preparazzjoni

L-annimali huma miżmuma f'kondizzjonijiet sperimentali ta' akkomodazzjoni u nutrizzjoni għal mill-inqas hamest ijiem qabel ma jsir l-esperiment. Qabel ma jsir l-esperiment, l-annimal żgħar u b'saħħithom huma mħawwdin b'mod każwali u assenjati għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll.

Is-sustanza in eżami tista' tkun somministrata fid-dieta, permezz ta' pompa, f'kapsuli jew ilma tax-xorb. L-annimali kollha għandhom jingħataw id-doża bl-istess metodu matul il-perjodu kollu ta' l-esperiment. Jekk jintużaw mezzi jew addittivi oħra sabiex ikun faċilitat il-metodu ta' kif tingħata d-doża, dawn m'għandhomx jipproduċu effetti tossiċi.

Kondizzjonijiet sperimentali

Annimali sperimentali

Sakemm ma jirriżultawx kontra-indikazzjonijiet, l-ispeċji l-aktar preferit huwa l-far. Għandhom jintużaw razes li huma komunement utilizzati fil-laboratorju ta' annimali żgħar u b'saħħithom u d-doża għanda tibda idejalment qabel ma' l-firien ikunu laħqu l-età ta' sitt ġimgħat (f'kull każ, iżda, mhux aktar minn tmien ġimgħat). Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandux jaqbeż +20% tal-valur medju. Fejn isir studju sub-kroniku orali bħala preliminari għall-istudju fit-tul, l-istess speċji u razez għandhom jintużaw fiż-żewġ studji.

Numru u sess

Mill-inqas 20 annimal (10 nisa u 10 rġiel) għandhom ikunu utilizzati f'kull livell tad-doża. In-nisa għandhom ikunu nullipari u mhux tqal. Jekk huwa previst is-sagrifiċċju fl-f'intervalli, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali li huwa previst li sejrin ikunu sagrifikati qabel ma jkun terminat l-istudju. Barra minn hekk, grupp satelliti ta' 20 annimal (10 annimali ta' kull sess) jista' jkun ittrattat bl-għola livell tad-doża għal 90 ġurnata u osservat għar-reversibilità, persistenza, jew okkorrenza ritardjata ta' effetti tossiċi għal 28 ġurnata wara t-trattament.

Livelli ta' doża

Għandhom jintużaw mill-inqas tlett livelli ta' doża u kontroll wieħed. Bl-eċċezzjoni għat-trattament bis-sustanza sperimentata, l-annimali tal-grupp tal-kontroll għandhom ikunu ttrattati b'mod identiku għall-dawk tal-grupp sperimentat. Fejn huwa użat mezz sabiex id-doża ġġ ikun faċilitat, il-kontrolli għandhom ikunu somministrati bid-doża b'dak il-mezz fl-istess mod tal-gruppi li huma ttrattati; l-annimali tal-kontroll għandhom jirċievu l-istess kwantità ta' dak il-mezz bħal dik riċevuta mill-grupp ttrattat bil-livell ta' l-għola doża. Il-livell ta' l-għola doża għandu jipprovoka effetti tossiċi iżda ma jikkawżax jew jikkawża ftit imwiet. Dak il-livell ta' doża l-iktar baxx m'għandux jipproduċi prova ta' tossiċità. Meta teżisti valutazzjoni utili għall-espożizzjoni umana, il-livell l-aktar baxx għandu jeċċedi dan il-valur. Idejalment, il-livell ta' doża intermedju għandu jipproduċi effetti tossiċi minimi u li jistgħu jkunu osservati. Jekk tkun użata iktar minn doża intermedja, il-livelli ta' doża għandhom ikunu maqsuma f'intervalli sabiex jipproduċu gradazzjoni ta' effetti tossiċi.

Fil-gruppi ttrattati bil-livelli ta' doża baxx u intermedju u fil-kontrolli, l-inċidenza ta' konsegwenzi fatali għandha tkun baxxa sabiex tippermetti valutazzjoni sinifikattiva tar-riżultati.

Meta s-sustanza sperimentata tkun somministrata fid-dieta, jistgħu ikunu utilizzati kemm konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm jew mg/kg ta' ikel) jew livell ta' doża kostanti skond il-piż tal-ġisem ta' l-annimali; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal dik is-sustanza li tingħata permezz ta' pompa, id-doża għandha tingħata kuljum u fl-istess ħin. Il-livelli ta' doża għandhom ikunu adattati b'intervalli (kull ġimgħa jew kull ġimgħatejn) sabiex jinżamm il-livell ta' doża kostanti skond il-piż tal-ġisem ta' l-annimal.

Studju limitat

Jekk studju ta' 90 ġurnata magħmul skond il-metodu mniżżel hawn taħt, f'livell ta' doża ta' 1000mg/kilogramma ta' piż tal-ġisem/ġurnata, jew livell għoli ta' doża relatat għall-espożizzjoni umana, (fejn din tkun osservata) ma tipproduċiex provi ta' effetti tossiċi, provi oħra jistgħu jkunu kkunsidrati li mhumiex neċessarji. Għal dawk is-sustanzi ta' tossiċità baxxa huwa importanti li jkun assikurat illi meta jkunu somministrati fid-dieta, il-kwantitajiet u l-proprjetajiet oħra tas-sustanza sperimentata nvoluti ma jintervjenux fil-bżonijiet nutrizzjonali normali.

Perjodu ta' osservazzjoni

L-annimali kollha għandhom ikunu osservati kuljum u rreġistrati sinjali ta' tossiċità inkluż il-ħin meta nbdiet, il-grad u d-dewmien. Il-ħin tal-mewt u l-ħin meta dehru u sparixxew sinjali ta' tossiċità għandu jkun rreġistrat.

Proċedura

L-annimali għandhom ikunu ttrattati bis-sustanza sperimentata idejalment sebat ijiem kull ġimgħa għal perjodu ta' 90 ġurnata. L-annimali li jappartjenu għal grupp satellita previst għall-osservazzjonijiet li sejrin jitkomplew għandhom jinżammu għal perjodu ta' 28 ġurnata mingħajr trattament sabiex ikun skopert il-fejqan jew il-persistenza ta' l-effetti tossiċi.

L-osservazzjonijiet kliniċi għandhom jinkludu il-bidliet fil-ġilda u fil-pil, l-għajnejn u l-mukuż kif ukoll is-sistema nervuża u awtonomika, dik respiratorja u ċirkulatorja, l-attività somatomorja u dik komportamentali. Għandu jitkejjel il-konsum ta' l-ikel (u l-konsum ta' l-ilma meta s-sustanza sperimentata tingħata fl-ilma taxxorb) u l-piż ta' l-annimali kull ġimgħa.

Osservazzjoni regolari ta' l-annimali hija meħtieġa sabiex ikun evitat kemm jista' jkun telf ta' annimali mill-esperiment minħabba kawżi bħall-kannibaliżmu, l-awtolisi ta' tessuti jew it-tqegħid ta' xi ħaġa mhux f'postha. Fl-aħħar tal-perjodu ta' sperimentazzjoni dawk l-annimali li jibqgħu ħajja jkunu sottoposti għall-awtopsja. L-annimali mejta għandhom jitneħħew u jkunu sottoposti għall-awtopsja.

L-eżamijiet is-segwenti iseħħu abitwalment għall-annimali kollha inklużi l- kontrolli:

(a) l-eżami oftalmoskopiku, li jsir permezz ta' oftalmoskopju jew apparat adattat u li huwa l-istess, għandu jsir qabel ma tkun mogħtija s-sustanza sperimentata u fl-aħħar ta l-istudju, preferibbiliment fuq kull annimal iżda għall-inqas fuq dawk illi jkunu mogħtija dożaġġ għoli u dawk fil-gruppi ta' kontroll. Jekk jinstabu tibdiliet fl-għajnejn, kull annimal għandu jkun eżaminat.

(b) fl-aħħar tal-perjodu ta' sperimentazzjoni, għandhom isiru s-segwenti analiżi:L-ematoloġija inkluż l-ematokrit, il-konċentrazzjoni ta' l-emoglobina, l-għadd ta' eritroċiti, l-għadd totali u differenzali tal-lewokoċite, u l-miżura tal-potenzal ta' demm magħqud bħaż-żmien li jieħu sabiex jagħqad, iż-żmien ta' protrombina, iż-żmien tat-tromboplastina jew l-għadd ta' pjastrina.

(c) id-determinazzjoni tal-bijokimika klinika fuq id-demm għandha ssir fl-aħħar tal-perjodu ta' sperimentazzjoni. Oqsma ta' eżami li huma meqjusa xierqa għall-istudji kollha hima: il-bilanċ ta' l-elettroliti, il-metaboliżmu tal-karboidrati, il-funzjoni tal-fwied u tal-kliewi. L-għazla ta' eżamijiet speċifiċi jkun determinat mill-osservazzjonijiet fuq il-mod ta'azzjoni tas-sustanza. Huma suġġeriti s-segwenti kalkoli: kalċju, fosfru, klorur, sodju, potassju, glukosju sawmi (bil-perjodu ta' sawm adattat għall-ispeċje), is-serum glutamiku piruviku transaminasi ([1]), is-serum glutamiku ossaliku transaminasi ([2]), ornitina dekarbossilasi, gamma glutamika transpeptidas,ażotu urejku, albumina, kreatinina tad-demm, bilirubina totali u kejl tal-proteini totali tas-serum. Determinazzjonijiet oħra li jistgħu jkunu meħtieġa għall-valutazzjoni tossikoloġika jinkludu l-analiżi tal-lipidi, ta' l-ormoni, ekwilibriju ta' l-aċtu/baži, attività metaemoglobina u kolinesterasi. Determinazzjonijiet bijokimiċi supplimentari jistgħu jkunu użati, jekk huwa l-każ, sabiex ir-riċerka dwar l-effetti osservati tkun estiża.

([1]) Issa magħrufa bħal serum alanini aminotransferasi
([2]) Issa magħrufa bħal serum aspartate aminotransferasi

(d) l-analiżi ta' l-awrina mhijiex rikjesta skond ir-rutina izda meta l-indikazzjoni tkun bbażata fuq it-tossiċità prevista jew osservata biss.

Jekk id-data storika tal-linja bażi mhijiex suffiċjenti, qabel ma tingħata d-doża għandu jittieħed kont tad-determinazzjoni tal-parametri bijokimiċi.

Nekroskopija makroskopika

L-annimali kollha għandhom ikunu sottoposti għal nekroskopija makroskopika sħiħa li tinkludi l-eżami tas-superfiċje esterna tal-ġisem, ta' l-orifiċi kollha, tal-kavitajiet kranjali, tat-toraċi u addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, il-glandoli adrenali u t-testikoli għandhom jintiżnu meta jkunu għadhom imxarrba u malajr kemm jista' jkun wara li jkunu analizzati qabel ma jinxfu.

L-organi u t-tessuti s-segwenti għandhom ikunu miżmuma tajjeb f'mezzi adattati għall-eżami istopatoloġiku li jista' jsir fil-futur: kull leżjoni makroskopika, il-moħħ – inkluż partijiet tal-mudullun/pont, il-kortiċi taċ-ċervellet u l-kortiċi ċerebrali, il-glandoli pitwitarji, it-tirojde/il-paratirojde, kwalunkwe tessuti timiku, it-trakea u l-pulmun, il-qalb, l-aorta, (glandoli tar-rieq), il-fwied, il-milsa, il-kliewi, l-adrenali, il-frixa, il-gonad, l-utru (organi ġenetali aċċessorji), (il-ġilda), l-esofagu, l-istonku, id-duwodenu, id-diġunu, l-ilju, il-musrana l-għamja, il-musrana l-ħoxna, il-musrana d-dritta, il-bużżieqa ta' l-awrina, il –glandola limfatika rapprezentattiva, (il-glandola mammarja femminili), (il-muskulatura tal-koxxa), in-nerv periferali, l-isternu bil-mudullun ta' l-għadam, (l-għajnejn), (il-femur, inkluż is-superfiċje artikolari), (ix-xewka tad-dahar fuq tlett livelli – ċervikali, toraċi-medju, u l-ġenbejn) u (l-glandoli esorbitali tad-dmugħ). It-tessuti li jidhru fil-parentesi għandhom ikunu eżaminati biss jekk jidhru xi sintomi ta' tossiċita jew indikazzjoni li huma l-organu mmirat involut).

Eżami istopatoloġiku

(a) L-eżami istopatoloġiku sħiħ għandu jsir fuq l-organi u t-tessuti ta' l-annimali fil-gruppi ttrattati b'livell għoli ta'dożaġġ u dawk fil-grupp tal-kontroll;

(b) Il-leżjonijiet makroskopiċi kollha għandhom ikunu eżaminati;

(c) L-eżami ta' l-organi mmirati f'gruppi oħra ttrattati b'doża oħra;

(d) Il-pulmuni ta' l-annimali fil-gruppi ttrattati bid-dożaġġ ta' livell baxx jew intermedju għandhom ikunu sottoposti għall-eżami istopatoloġiku sabiex tkun individwata xi infezzjoni, peress illi din ta' l-aħħar tipprovdi valutazzjoni approprjata ta' l-istat tas-saħħa ta' l-annimal. Għandha tingħata attenzjoni partikolari lill-eżami istopatoloġiku tal-fwied u tal-kliewi f'dawn il-gruppi. Jista' jagħti l-każ illi l-eżami istopatoloġiku utlerjuri ma jsirx ta' sikwit fuq l-annimali f'dawn il-gruppi iżda għandu dejjem isir fl-organi li jippreżentaw provi ta' leżjonijiet, fil-grupp trattat bl-għola livell ta'doża;

(e) meta huwa utilizzat grupp satellita, għandu jsir l-eżami istopatoloġiku ta' t-tessuti u ta' l-organi li jippreżentaw leżjonijiet fil-gruppi ttrattati.

2. DATA

Id-data għandha tkun imqassra f'forma ta' tabella fejn ikun indikat għal kull grupp in-numru ta' annimali fil-bidu tal-prova, in-numru ta' annimali li juru leżjonijiet u l-persentaġġ ta' l-annimali li juru kull tip ta' leżjoni. Ir-riżultati għandhom ikunu evalwati bil-metodu ta' l-istatistika approprjata. Kwalunkwe metodu ta' statistka rikonoxxuta jista' jkun użat.

3. IR-RAPPORT

3.1 Ir-rapport ta' l-istudju

Ir-rapport dwar il-prova għandu jkollu l-informazzjoni s-segwenti:

— speċji, razez, sors, kondizzjonijiet ambjentali, dieta,

— kondizzjonijiet sperimentali,

— il-livelli tad-doża (inkluż il-mezzi użati, jekk huwa użat) u l- konċentrazzjonijiet,

— livell mingħajr effett meta huwa possibbli,

— data dwar ir-risposti tossiċi skond is-sess u d-doża,
— il-ħin tal-mewt matul l-esperiment jew jekk l-annimali baqgħux ħajjin sa l-aħħar,
— deskrizzjoni ta' l-effetti tossiċi jew effetti oħra,
— il-ħin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anomalu jew ġrajjiet suċċessivi;
— data dwar l-ikel u l-piż tal-ġisem,
— riżultati oftalmoloġiċi,
— analiżi ematoloġika użata u r-riżultati kollha,
— analiżi tal-bijokimika klinikali użata u r-riżultati kollha (inkluż ir-riżultat ta' kull analiżi ta' l-awrina),
— necropsy findings,
— deskrizzjoni dettaljata dwar ir-riżultati,
— l-elaborazzjoni statistka tar-riżultati, fejn huwa possibbli,
— diskussjoni tar-riżultati,
— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2 **Valutazzjoni u nterpretazzjoni**

Ara Introduzzjoni Ġenerali, Parti B

4. **REFERENZI**

Ara Introduzzjoni Ġenerali, Parti B

EŻAMI TA' TOSSIĊITA ORALI SUB-KRONIKU

ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻI GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊJI TA' ANNIMALI MHUX GERRIEMA

1. **METODU**

1.1 **Introduzzjoni**

Ara Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.2 **Definizzjonijiet**

Ara Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.3 **Sustanzi Riferiti**

L-ebda

1.4 **Prinċipji tal-metodu ta' l-eżami**

Is-sustanza sperimentata għanda tkun somministrata kuljum, b'mod orali, f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' annimali tal-laboratorju (li mhumiex annimali gerriema), doża waħda għal kull grupp għall-perjodu ta' 90 ġurnata. Matul il-perjodu ta' somministrazzjoni, l-annimali huma osservati kuljum sabiex ikunu osservati sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu matul l-eżami huma sottoposti għall-nekroskopija, fl-aħħar ta' l-istudju dawk l-annimali li jsalvaw huma wkoll sottoposti għall-nekroskopija.

1.5 **Kriterji kwalitativi**

L-ebda

1.6 **Deskrizzjoni tal-metodu ta' l-eżami**

Preparazzjoni

L-annimali huma miżmuma f'kondizzjonijiet sperimentali ta' akkomodazzjoni u nutrizzjoni għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jsir l-esperiment. Qabel ma jsir l-esperiment, l-annimal żgħar u b'saħħithom huma mħawwdin b'mod każwali u assenjati fill-gruppi tat-trattament u tal-kontroll.

Is-sustanza sperimentata tista' tkun somministrata fid-dieta jew permezz ta' kapsuli li tista' tkun iktar komda. Mezzi oħra ta' somministrazzjoni orali jistgħu jintużaw. L-annimali kollha għandhom jingħataw id-doża bl-istess metodu matul il-perjodu kollu ta' l-esperiment. Jekk jintużaw mezzi jew addittivi oħra sabiex ikun faċilitat il-metodu ta' kif tingħata d-doża, dawn m'għandhomx jipproduċu effetti tossiċi. Tista' tintuża data storika skond il-ħtieġa.

Kondizzjonijiet sperimentali

Annimali sperimentali

L-ispeċji ta' l-annimali li mhumiex gerriema l-aktar utilizzat huwa l-kelb. Speċji oħra ta' annimali li mhumiex gerriema jistgħu ikunu utilizzati. Għandhom jintużaw annimali żgħar u b'saħħithom, u fil-każ tal-kelb, id-dożaġġ għandu jibda idejalment mill-età ta' erba' sa sitt xhur u mhux aktar tard minn disa' xhur. Meta jsir studju sub-kroniku orali bħala studju preliminari għal dak l-istudju li jsir fit-tul, l-istess specji/nisel għandu jintuża fiż-żewġ studji.

Numru u sess

Mill-inqas tmien annimali (erba' nisa u erba' rġiel) għandhom ikunu użati għal kull livell ta' doża. Fl-aħħar ta' l-istudju in-numru ta' l-annimali għandu jiggarantixxi valutazzjoni sinifikattiva ta' l-effetti tossiċi.

Livelli ta' doża

Iridu jintużaw mill-inqas tlett livelli ta' doża u kontroll wieħed. Bl-eċċezzjoni għat-trattament bis-sustanza sperimentata, l-annimali tal-grupp tal-kontroll għandhom ikunu ttrattati b'mod identiku għall-dawk tal-grupp sperimentat. Il-livell ta' l-għola doża għandu jipprovoka effetti tossiċi izda ma jikkawżax jew jikkawża ftit imwiet.

Dak il-livell ta' doża l-iktar baxx m'għandux jipproduċi prova ta' tossiċità. Meta teżisti valutazzjoni utili għall-espożizzjoni umana, il-livell l-aktar baxx għandu jeċċedi dan il-valur.

Idejalment, il-livell ta' doża intermedju għandu jipproduċi effetti tossiċi minimi u li jistgħu jkunu osservati. Jekk tkun użata iktar minn doża intermedja, il-livelli ta' doża għandhom ikunu maqsuma f'intervalli sabiex jipproduċu gradazzjoni ta' effetti tossiċi.

Fil-gruppi trattati bil-livelli ta' doża baxxi u intermedjarji u fil-kontrolli, m'għandux ikun hemm każijiet ta' mwiet.

Meta s-sustanza sperimentata tkun somministrata fid-dieta, jistgħu ikunu utilizzati kemm konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm jew mg/kg ta' ikel) jew livell ta' doża kostanti skond il-piż tal-ġisem ta' l-annimali; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Meta d-doza tinghata direttament, per ezempju permezz ta' kapsuli, id-doża għandha tingħata kuljum u fl-istess ħin, u adattata skond il-kaz b'intervalli ta' ġimgha sabiex jinżamm il-livell ta' doża kostanti skond il-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Fejn qiegħed isir studju sub-kroniku bħala studju preliminari għall-istudju li jsir fit-tul ta' żmien, fiż-żewġ studji għandha tkun użata l-istess dieta.

Studju limitat

Jekk studju ta' 90 ġurnata magħmul skond il-metodu mniżżel hawn taħt, f'livell ta' doża ta; 1000mg/kilogramma ta' piż tal-ġisem/ġurnata, jew livell għoli ta' doża relatat għall-espożizzjoni umana, (fejn din tkun osservata) ma tipproduċiex provi ta' effetti tossiċi, provi oħra jistgħu jkunu kkunsidrati li mhumiex neċessarji. Għal dawk is-sustanzi ta' tossiċità baxxa huwa importanti li jkun assikurat illi meta jkunu somministrati fid-dieta, il-kwantitajiet u l-proprjetajiet oħra tas-sustanza sperimentata nvoluti ma jintervjenux fil-bżonnijiet nutrizzjonali normali.

Perjodu ta' osservazzjoni

L-annimali kollha għandhom ikunu osservati kuljum u rreġistrati sinjali ta' tossiċità inkluż il-ħin meta nbdiet, il-grad u d-dewmien. Il-ħin tal-mewt u l-ħin meta dehru u sparixxew sinjali ta' tossiċità għandu jkun rreġistrat.

Proċedura

L-annimali għandhom ikunu ttratati bis-sustanza sperimentata idejalment sebat ijiem kull ġimgħa għal perjodu ta' 90 ġurnata. Izda, fuq il-bażi prinċipali tal-kunsiderazzjonijiet prattiċi, meta s-sustanza tingħata b'mod differenti minn dik li tingħata fid-dieta, id-dożaġġ bbażat fuq ħamest ijiem fil-ġimgħa huwa kkunsidrat aċċettabbli.

L-osservazzjonijiet kliniċi għandhom jinkludu, iżda ma jkunux limitati, għall-bidliet fil-ġilda u fil-pil, l-għajnejn u l-mukuż kif ukoll is-sistema nervuża u awtonomika, dik respiratorja u ċirkulatorja, l-attività somatomorja u dik komportamentali. Għandu jitkejjel il-konsum ta' l-ikel (u l-konsum ta' l-ilma meta s-sustanza sperimentata tingħata fl-ilma tax-xorb) u l-piż ta' l-annimali kull ġimgħa.

Għandu jsir eżami kliniku bir-reqqa ta' l-annimali kull ġurnata skond miżuri xierqa sabiex ikun imnaqqas it-telf ta' l-annimali ta' l-istudju. Fl-aħħar tal-perjodu ta' espożizzjoni dawk l-annimali li jibqgħu ħajja jkunu sottoposti għall-awtopsja. L-annimali mejta għandhom jitneħħew u jkunu sottoposti għall-awtopsja.

L-eżamijiet is-segwenti iseħħu abitwalment għall-annimali kollha inklużi l-kontrolli:

(a) l-eżami oftalmoskopiku, li jsir permezz ta' oftalmoskopju jew apparat adattat u li huwa l-istess, għandu jsir qabel ma tkun mogħtija s-sustanza sperimentata u fl-aħħar ta l-istudju, preferibbiliment fuq kull annimal iżda għall-inqas fuq dawk illi jkunu mogħtija dożaġġ għoli u dawk fil-gruppi ta' kontroll. Jekk jinstabu tibdiliet fl-għajnejn, kull annimal għandu jkun eżaminat.

(b) fil-bidu ta' l-istudju, u f'intervalli ta' xahar jew fin-nofs tal-perjodu ta' l-istudju u, fl-aħħar ta' l-istudju, għandhom isiru s-segwenti analiżi: l-ematoloġija inkluż l-ematokrit, il-konċentrazzjoni ta' l-emoglobina, l-għadd ta' eritroċiti, l-għadd totali u differenzali tal-lewokoċite, u l-miżura tal-potenzal ta' demm magħqud bħaż-żmien li jieħu sabiex jagħqad, iż-żmien ta' protrombina, iż-żmien tat-tromboplastina jew l-għadd ta' pjastrina.

(c) id-determinazzjoni tal-bijokimika klinika fuq id-demm għandha ssir fil-bidu ta' l-istudju, u f'intervalli ta' xahar jew fin-nofs tal-perjodu ta' l-istudju u fl-aħħar ta' l-istudju. Oqsma ta' eżami li huma meqjusa xierqa għall-istudji kollha huma: il-bilanċ ta' l-elettroliti, il-metaboliżmu tal-karboidrati, il-funzjoni tal-fwied u tal-kliewi. L-għażla ta' l-eżamijiet speċifiċi jkun determinat mill-osservazzjonijiet fuq il-mod ta'azzjoni tas-sustanza. Huma suġġeriti s-segwenti kalkoli: kalċju, fosfru, klorur, sodju, potassju, glukosju swami (bil-perjodu ta' sawm adattat għall-ispeċje), is-serum glutamiku piruviku transaminasi ([1]), is-serum glutamiku ossaliku transaminasi ([2]), ornitina dekarbossilasi, gamma glutamika transpeptidas,ażotu urejku, albumina, kreatina, it-total tal-qjies tal-proteini tal-bilirubin u tas-serum. Determinazzjonijiet oħrajn li jistgħu jkunu neċessarji għal valutazzjoni xierqa tossikoloġika jinkludu analiżi tal-lipidi, ormoni, bilanċ ta' l-aċidu/alkali, attività metemoglobina u kolìnestera. Bijokimika klinika addizzjonali tista' tkun użata fejn neċessarju biex tiġi estiża linvestigazzjoni ta' l-effetti osservati. Mammali mhux gerriema għadhom jiġu msawmin għal perijodu (mhux iktar minn 24 siegħa) qabel jittieħdulhom il-kampjuni tad-demm.

([1]) Issa magħrufa bhal serum alanini aminotransferasi
([2]) Issa magħrufa bhal serum aspartate aminotransferasi

(d) Analiżi kimika ta' l-awrina m'hijiex meħtieġa fuq bażi ta' rutina iżda hija biss meħtieġa meta hemm indikazzjoni bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata.

Nekroskopija totali

L-annimali kollha għandhom ikunu soġġetti għal nekroskopija totali u sħiħa li tinkludi eżami tas-superfiċje esterna tal-ġisem, ta' kull fetħa tal-ġisem, u tal-ħofor kranjali, toraċiċi u addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-tirojde (bil-paratirojde), u t-testikoli għandhom ikunu peżati friski malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex jiġi evitat li jixxottaw.

L-organi u t-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati għal xi eżamijiet istopatoloġiċi futuri possibbli: il-ħsarat kbar fil-ġisem, il-moħħ – inklużi sezzjonijiet tal-medulla/parti ta' l-għerq tal-moħħ li tgħaqqad il-medulla oblongata mat-talamu, il-kortiċi taċ-ċervellett u l-kortiċi celebrali, it-tessut pitwitarju, it-tessut tat-tirojde jew tal-paratirojde, it-tessut tat-timu, (it-trakea), il-pulmuni, il-qalb, l-aorta, il-glandoli tar-rieq, il-fwied, il-milsa, il-kliewi, l-adrenali, il-frixa, il-gonadi, l-utru (l-organi ġenitali aċċessorji), (il-ġilda), il-bużżieqa tal-marrara, l-esofagu, l-istonku, id-duwodenu, il-parti ta' bejn id-duwodenu u l-ilju, l-ilju, il-musrana l-għamja, il-musrana l-ħoxna, ir-rektum, il-bużżieqa ta' l-awrina, il-glandola limfatika rappreżentattiva, (il-glandola tal-ħalib tas-sess femminil), (il-muskolatura tal-koxxa), in-nerv periferali, (l-għajnejn), l-isternu bl-għadam tal-mudullun, (il-wirk, inkluża s-superfiċje artikulari), u (n-nerv li jgħaddi minn ġos-sinsla fuq tliet livelli - ċervikali, toraċiku tan-nofs u tal-ġenbejn). It-tessuti msemmijin fil-parentesi għandhom jiġu eżaminati biss jekk jiġu indikati permezz ta' sinjali ta' tossiċità, jew permezz ta' involviment ta' l-organu li huwa t-targit.

Eżami istopatoloġiku

Istopatoloġija sħiħa għandha tkun magħmula fuq l-organu u t-tessuti ta' l-annimali fil-gruppi tal-kontroll u fil-gruppi tad-doża qawwija. Istopatoloġija oħra fil-gruppi ta' dożi oħrajn għandha tiġi magħmula fuq organi u tessuti tagħhom li fil-gruppi tad-doża l-qawwija juru l-ħsara, jew fuq dawk li l-osservazzjonijiet tal-klinika li jindikaw dak il-bżonn.

2. DATA

Id-data għandha tiġi miġbura fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali li kien hemm fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li juru ħsara f'ġisimhom, it-tip ta' ħsara f'ġisimhom u l-persentaġġ ta' l-annimali li juru iż-żewġ tipi ta' ħsara. Ir-riżultati għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' l-istatistika xieraq. Kwalunkwe metodu ta' l-istatistika rikonoxxut jista' jintuża.

3. RAPPORTAR

3.1. Rapport tat-test

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

— in-nisel ta' l-ispeċi jew ir-razza, minn fejn ġejja l-ispeċi, il-kondizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta,

— il-kondizzjonijiet tat-test,

— il-livelli tad-doża (inkluża xi sustanza, jekk użata) u konċentrazzjonijiet,

— data tar-rispons tossiku, bis-sess u d-doża,

— il-livell fejn m'hemmx effett, meta possibbli,

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali ssopravivewx sat-tmiem,

— deskrizzjoni ta' effetti tossiċi jew effetti oħrajn (b'attenzjoni partikolari għal skoperti tal-klinika),

— il-ħin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u ż-żmien sussegwenti,

— data ta' l-għalf u tal-piż tal-ġisem,

— skoperti oftalmoloġiċi,

— testijiet ematoloġiċi użati u r-riżultati kollha,

— testijiet tal-bijokimika tal-klinika użati u r-riżultati kollha (inklużi r-riżultati ta' xi analiżi kimika ta' l-awrina),

— skoperti tan-nekroskopija,

— dekrizzjoni dettaljata ta' l-iskoperti istopatoloġiċi kollha,

— trattament ta' l-istatistika tar-riżultati fejn huwa xieraq,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ DERMALI SUB-KRONIKA

STUDJU DERMALI TAD-DOŻA RIPETUT GĦAL 90 ĠURNATA LI JUŻA SPEĊI TA' MAMMALI GERRIEMA

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Definizzjonijiet**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi ta' referenza**

Xejn

1.4. **Prinċipju tal-metodu tat-test**

Is-sustanza tat-test hija applikata ta' kuljum fuq il-ġilda f'doži ggradati fuq għadd ta' gruppi t'annimali esperimentali, doża waħda għal kull grupp għal perijodu ta' 90 ġurnata. Matul dan il-perijodu t'applikazzjoni l-annimali huma osservati ta' kuljum sabiex jiġu skoperti sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu waqt it-test issirilhom nekroskopija, u fit-tmiem tat-test l-annimali li jissopravivu ssirilhom nekroskopija.

1.5. **Kriterji tal-kwalità**

Xejn.

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Preparazzjonijiet

L-annimali huma miżmumin taħt kondizzjonijiet ta' sistemazzjoni u għalf esperimentali għal mill-inqas ħamest ijiem qabel it-test. Qabel it-test annimali żgħar u b'saħħithom huma magħżulin u assenjati lil gruppi ttrattati u gruppi tal-kontroll. Ftit qabel it-testijiet il-fur huwa imqasqas miż-żona dorsali tat-tronk ta' l-annimali tat-test. Taqxir jista' jiġi użat iżda jista' biss jiġi magħmul bejn wieħed u ieħor 24 siegħa qabel it-test. Tqasqis jew taqxir ripetut huwa s-soltu meħtieġ bejn wieħed u ieħor f'intervalli ta' ġimgħa. Meta jitqasqas jew jitqaxxar il-fur wieħed irid joqgħod attent li jevita li jobrox il-ġilda. Mhux inqas minn 10% tal-piż ta' l-erja tas-superfiċje tal-ġisem għandha tkun imnaddfa għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-piż ta' l-annimal irid jittieħed in konsiderazzjoni meta jkun irid jiġi deċiż liema żona trid tkun imnaddfa u d-dimensjonijiet tal-kisi. Meta jiġu ttestjati s-solidi, li jistgħu jiġu magħmula fi trab jekk dan ikun xieraq, is-sustanza tat-test trid tkun imrattba bl-ilma jew, fejn meħtieġ, b'sustanza oħra xierqa biex tiżgura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Sustanzi likwidi tat-test huma ġeneralment użati mhux iddilwiti. Applikazzjoni ta' kuljum fuq bażi ta' ħamest ijiem fil-ġimgħa jew ta' sebat ijiem fil-ġimgħa hija użata.

Kondizzjonijiet tat-test

Annimali esperimentali

Il-far adult, il-fenek jew il-fenek ta' l-Indi jista' jkun użat. Speċi oħrajn jistgħu ikunu użati iżda l-użu tagħhom ikun jeħtieġ ġustifikazzjoni. Fil-bidu tat-test il-limitu tal-varjazzjoniji tal-piżijiet għandha tkun ± 20% tal-piż intermedju. Fejn ikun amministrat test sub-kroniku dermali bħala minn studju preliminarju sa studju għal tul ta' żmien, l-istess speċi u razza għandha tintuża fiż-żewġ studji.

Numru u sess

Mill-inqas 20 annimal (10 ta' sess femminili u 10 ta' sess maskili) b'ġilda f'saħħitha għandhom ikunu użati f'kull livell tad-doża. L-annimali tas-sess femminili għandhom ikunu annimali li qatt ma welldu jew li m'humiex inċinta. Jekk hu ppjanat li xi annimali se jkunu ssagrifikati fl-intervall in-numru tagħhom għandu jkun miżjud skond in-numru t'annimali skedat biex jiġi ssagrifikat qabel it-terminu ta' l-istudju. B'addizzjoni ma' dan, grupp subordinat ta' 20 annimal (10 annimali għal kull sess) jistgħu jkunu ttrattati b'doża ta' livell qawwi għal 90 ġurnata u osservati għal riversibilità, persistenza jew okkorrenza ttardjata ta' effetti tossiċi għal 28 ġurnata wara t-trattament.

Livelli tad-doża

Mill-inqas tliet livelli tad-doża huma meħtieġa b'kontroll jew b'sustanza ta' kontroll jekk xi sustanza bħal din hija użata. Il-perijodu t'esposizzjoni għandu jkun mill-inqas ta' sitt siegħat kuljum. L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun magħmula f'ħinijiet simili kuljum, u l-ammont tas-sustanza applikata għandu jiġi aġġustat f'intervalli (ta' kull ġimgħa jew ta' kull ġimgħatejn) sabiex il-livell tad-doża, f'termini ta' piż tal-ġisem ta' l-annimali, jinżamm kostanti. Għajr għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jiġu ttrattati b'manjiera identika ta' dawk is-soġġetti tal-grupp tat-test. Fejn sustanza tkun użata sabiex jiġi ffaċilitat id-dożaġġ, il-grupp tal-kontroll għandu jkun mogħti doża bħal dik tal-gruppi ttrattati, u jirċievi l-istess ammont bħal dak li jkun riċevut mill-grupp ta' l-iktar livell qawwi ta' doża. L-iktar livell qawwi ta' doża għandu jirriżulta f'effetti tossiċi iżda ma jipproduċi l-ebda, jew ftit, fatalitajiet. L-inqas livell ta' doża m'għandux jipproduċi xi evidenza ta' tossiċità. Fejn hemm estimazzjoni użabbli ta' esposizzjoni umana l-inqas livell ta' doża jrid jaqbeż lil din l-estimazzjoni. Idealment, il-livell ta' doża intermedju għandu jipproduċi effetti tossiċi osservabbli minimi. Jekk iktar minn doża waħda intermedja hija użata, il-livelli tad-doża għandhom ikunu spazjati sabiex tiġi prodotta gradazzjoni ta' effetti tossiċi. Fil-gruppi baxxi u intermedji, u fil-gruppi tal-kontroll, l-inċidenza tal-fatalitajiet għandha tkun baxxa, biex tippermetti valutazzjoni sinjifikanti tar-riżultati.

Jekk l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test tipproduċi irritazzjoni severa tal-ġilda il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu mnaqqsin u dan jista' jirriżulta fi tnaqqis jew f'assenza ta' effetti tossiċi oħrajn fil-livell qawwi tad-doża. Jekk lill-ġilda saritilha ħsara jista' jkun neċessarju li l-istudju jiġi terminat u jsir studju ieħor b'konċentrazzjonijiet iktar baxxi.

Test ta' limitu

Jekk studju preliminarju b'livell ta' doża ta' 1 000 mg/kilogramma, jew doża ogħla, relatata ma' esposizzjoni umana possibbli, fejn hija magħrufa, ma jipproduċix l-ebda effetti tossiċi, testijiet iktar minn hekk jistgħu ma jkunux konsiderati neċessarji.

Perijodu t'osservazzjoni

L-annimali esperimentali għandhom ikunu osservati ta' kuljum għal sinjali ta' tossiċità. Il-ħin tal-mewt u l-ħin li fih jidhru s-sinjali tat-tossiċità għandhom ikunu miżmumin.

Proċedura

L-annimali għandhom jiġu magħluqin ġo gaġġa individwalment. L-annimali għandhom jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test, idealment fuq bażi ta' sebat ijiem fil-ġimgħa, għal perijodu ta' 90 ġurnata.

L-annimali fi gruppi subordinati skedati għal osservazzjonijiet ta' wara għandhom jiġu miżmuma għal 28 ġurnata iktar mingħajr trattament sabiex jiġi osservat l-irkupru mill-jew il-persistenza ta' l-effetti tossiċi. Il-ħin ta' l-esposizzjoni għandu jkun ta' sitt sieghat kuljum.

Is-sustanza tat-test għandha tkun applikata uniformement fuq żona li hija bejn wieħed u ieħor 10% tas-superfiċje totali tal-ġisem. Fejn is-sustanzi huma tossiċi ħafna, l-erja tas-superfiċje miksija tista' tkun inqas iżda l-istess ammont ta' l-erja għandu jiġi miksi b'rita rqieqa u uniformi daqs kemm hu possibbli.

Matul l-esposizzjoni is-sustanza tat-test hija miżmuma f'kuntatt mal-ġilda permezz garża poruża u b'tejp li ma jirritax. Is-sît tat-test għandu jkun miksi iktar minn hekk b'mod xieraq biex iżomm il-garża u s-sustanza tat-test u jiżgura li l-annimali ma jkunux jistgħu jibilgħu is-sustanza tat-test. Rażżâna jistgħu jiġu użati sabiex jipprevejenu l-inġestjoni tas-sustanza tat-test iżda l-immobilizzazzjoni kompleta tas-sustanza tat-test m'huwiex metodu rakkomandat.

Fit-terminu tal-perijodu ta' l-esposizzjoni, xi sustanza residwa tat-test għandha tiġi mneħħija fejn huwa prattiku permezz ta' l-ilma jew b'metodu ieħor xieraq li jnaddaf il-ġilda.

L-annimali kollha għandhom jiġu osservati ta' kuljum u sinjali ta' tossiċità għandhom ikunu miżmuma, inkluż il-ħin ta' l-ewwel attakk tagħhom, il-grad tagħhom u d-dewmien tagħhom. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-ġilda u fil-fur, fl-għajnejn u fil-membrani mukuża, kif ukoll fis-sistemi respiratorji, ċirkulatorji, awtonomiċi u nervuża ċentrali, fl-attività somatomotorja u fil-mudell ta' komportament. Qjisien tal-konsum ta' l-ikel għandhom jittieħdu ta' kull ġimgħa. Osservazzjonijiet regolari ta' l-annimali huma neċessarju sabiex l-annimali ma jiġux mitlufin mill-istudju minħabba kawżi bħal kannibaliżmu, awtolisi tat-tessuti jew minħabba li jiġu mqiegħdin f'post ieħor. Fit-terminu tal-perijodu ta' l-istudju s-sopravissuti fil-gruppi tat-trattament mhux subordinati issirilhom nekroskopija. Annimali moribondi għandhom jiġu mneħħija u għandha ssirilhom nekroskopija meta jkun avżat.

Dawn l-eżamijiet huma s-soltu magħmulin fuq l-annimali kollha inklużi dawk tal-kontroll:

(a) Eżami oftalmoloġiku, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir addattat ekwivalenti, għandu jiġi magħmul qabel l-esposizzjoni għas-sustanza tat-test u fit-terminu ta' l-istudju, preferibbilment fuq kull animal iżda mill-inqas fuq l-annimali tad-doża qawwija u fuq dawk tal-kontroll. Jekk tibdiliet fl-għajnejn huma skoperti l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati.

(b) Ematoloġija, inklużi l-ematokrit, il-konċentrazzjoni ta' l-emoglobina, il-kwantità ta' l-eritroċit, it-total u d-differenzali tal-kwantità ta' l-eritroċit, u l-qjies tal-potenzal tat-tagħqid tad-demm, bħall-ħin tat-tagħqid, il-ħin tal-protrombin, il-ħin tat-tromboplastin, jew il-kwantità tad-diski ż-żgħar fid-demm, għandhom ikunu nvestigati fit-terminu tal-perijodu tat-test.

(c) Determinazzjoni tal-bijokimika tal-klinika fuq id-demm għandha tkun magħmula fit-terminu tal-perijodu tat-test. Iż-żoni tat-test li huma konsiderati xierqa għall-istudji kollha huma l-bilanċ elettrolit, il-metaboliżmu tal-karboidrati, il-funzjoni tal-fwied u tal-kliewi. Is-selezzjoni ta' testijiet speċifiċi jiġu nfluwenzati b'osservazzhonijiet fuq il-mod t'azzjoni tas-sustanza. Determinazzjonijiet suġġeriti huma l-kalċju, l-fosfru, l-kloru, s-sodju, l-potassju, il-glukosju tas-sawm (b'perijodu ta' sawm addattat għall-ispeċi), transaminat tas-serkum glutamiku pirviku ([1]), transaminat tas-serum glutamiku ożaloċetiku ([2]), dekarbonat ta' l-ornitin, transpeptidu tal-gamma glutamiku, nitroġenu ta' l-urea, albumina, kreatina tad-demm, u t-total tal-qjies tal-proteini tal-bilirubin u tas-serum.

Determinazzjonijiet oħrajn li jistgħu jkunu neċessarji għal valutazzjoni xierqa tossikoloġika jinkludu analiżi tal-lipidi, ormoni, bilanċ ta' l-aċidu/alkali, attività metemoglobina u kolìnestera. Bijokimika tal-klinika addizzjonali tista' tkun użata fejn ikun neċessarju sabiex tiġi estiża l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati.

(d) Analiżi kimika ta' l-awrina m'hijiex meħtieġa fuq bażi ta' rutina iżda hija biss meħtieġa meta hemm indikazzjoni bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata.

Jekk id-data storika tal-linja bażi m'hijiex adegwata, għandha tingħata konsiderazzjoni lid-determinazzjoni tal-parametri tal-bijokimika ematoloġika u klinika qabel ma jibda d-dożaġġ.

Nekroskopija totali

L-annimali kollha għandhom ikunu soġġetti għal nekroskopija totali u sħiħa li tinkludi eżami tas-superfiċje esterna tal-ġisem, ta' kull fetħa tal-ġisem, u tal-ħofor kranjali, toraċiċi u addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-tirojde (bil-paratirojde), u t-testikoli għandhom ikunu peżati friski malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex jiġi evitat li jixxottaw. L-organi u t-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati għal xi eżamijiet istopatoloġiċi futuri possibbli: il-ħsarat kbar fil-ġisem, il-moħħ – inklużi sezzjonijiet tal-medulla/parti ta' l-għerq tal-moħħ li tgħaqqad il-medulla oblongata mat-talamu, il-kortiċi taċ-ċervellett u l-kortiċi celebrali, it-tessut pitwitarju, it-tessut tat-tirojde jew tal-paratirojde, it-tessut tat-timu, (it-trakea), il-pulmuni, il-qalb, l-aorta, il-glandoli tar-rieq, il-fwied, il-milsa, il-kliewi, l-adrenali, il-frixa, il-gonadi, l-utru (l-organi ġenitali aċċessorji), (il-ġilda), il-bużżieqa tal-marrara, l-esofagu, l-istonku, id-duwodenu, il-parti ta' bejn id-duwodenu u l-ilju, l-ilju, il-musrana l-għamja, il-musrana l-ħoxna, ir-rektum, il-bużżieqa ta' l-awrina, il-glandola limfatika rappreżentattiva, (il-glandola tal-ħalib tas-sess femminil), (il-muskolatura tal-koxxa), in-nerv periferali, (l-għajnejn), l-isternu bl-għadam tal-mudullun, (il-wirk, inkluża s-superfiċje artikulari), u (n-nerv li jgħaddi minn ġos-sinsla fuq tliet livelli - ċervikali, toraċiku tan-nofs u tal-ġenbejn). It-tessuti msemmijin fil-parentesi għandhom jiġu eżaminati biss jekk jiġu indikati permezz ta' sinjali ta' tossiċità, jew permezz ta' involviment ta' l-organu li huwa t-targit.

Eżami istopatoloġiku

(a) Istopatoloġija sħiħa għandha tiġi magħmula fuq ġilda normali u ttrattata u fuq l-organi u t-tessuti ta' l-annimali fil-gruppi tal-kontroll u tad-doża qawwija.

(b) Kull ħsara serja għandha tiġi eżaminata.

(c) Organi tat-targit fi gruppi ta' doża oħrajn għandhom jiġu eżaminati.

(d) Fejn il-firien huma użati, il-pulmuni ta' l-annimali fil-gruppi ta' doża baxxa u imtermedja għandhom jiġu soġġetti għal eżami istopatoloġiku għal evidenza ta' infezzjoni, billi dan jipprovdi valutazzjoni konvenjenti ta' l-istat ta' saħħa ta' l-annimali. Eżami istopatoloġiku iktar fil-fond jista' ma jkunx meħtieġ bħala rutina fuq l-annimali f'dawn il-gruppi, iżda għandu dejjem isir fl-organi li juru evidenza ta' ħsara fil-gruppi ta' doża qawwija.

(e) Meta grupp subordinat huwa użat, l-istopatoloġija għandha tkun magħmula fuq it-tessuti u fuq l-organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi l-oħrajn ittrattati.

2. **DATA**

Id-data għandha tiġi miġbura fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali li kien hemm fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li juru ħsara f'ġisimhom, it-tip ta' ħsara f'ġisimhom u l-persentaġġ ta' l-annimali li juru iż-żewġ tipi ta' ħsara. Ir-riżultati għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' l-istatistika xieraq. Kwalunkwe metodu ta' l-istatistika rikonoxxut jista' jintuża.

([1]) Issa magħrufa bħal serum alanini aminotransferasi
([2]) Issa magħrufa bħal serum aspartate aminotransferasi

3. **RAPPORTAR**

3.1. **Rapport tat-test**

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

— in-nisel ta' l-ispeċi jew ir-razza, minn fejn ġejja l-ispeċi, il-kondizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta,

— il-kondizzjonijiet tat-test,

— il-livelli tad-doża (inkluża xi sustanza, jekk użata) u konċentrazzjonijiet,

— data tar-rispons tossiku, bis-sess u d-doża,

— il-livell fejn m'hemmx effett, meta possibbli,

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali ssopravivewx sat-tmiem,

— deskrizzjoni ta' effetti tossiċi jew effetti oħrajn (b'attenzjoni partikolari għal skoperti tal-klinika),

— il-ħin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u ż-żmien sussegwenti,

— data ta' l-għalf u tal-piż tal-ġisem,

— skoperti oftalmoloġiċi,

— testijiet ematoloġiċi użati u r-riżultati kollha,

— testijiet tal-bijokimika tal-klinika użati u r-riżultati kollha (inklużi r-riżultati ta' xi analiżi kimika ta' l-awrina),

— skoperti tan-nekroskopija,

— dekrizzjoni dettaljata ta' l-iskoperti istopatoloġiċi kollha,

— trattament ta' l-istatistika tar-riżultati fejn huwa xieraq,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ TA' ĠBID GĦAL ĠOL-PULMUN SUB-KRONIKU

STUDJU TAD-DOŻA TA' ĠBID GĦAL ĠOL-PULMUN RIPETUT GĦAL 90 ĠURNATA LI JUŻA SPEĊI TA' MAMMALI GERRIEMA

1. METODU

1.1. Introduzzjoni

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. Definizzjonijiet

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. Sustanzi ta' referenza

Xejn

1.4. Prinċipju tal-metodu tat-test

Għadd ta' gruppi t'annimali esperimentali huma esposti ta' kuljum għal perijodu definit għas-sustanza tat-test f'konċentrazzjonijiet gradati, b'konċentrazzjoni waħda użata għal kull grupp, għal perijodu ta' 90 ġurnata. Fejn hemm sustanza użata biex tgħin il-ġenerazzjoni ta' konċentrazzjonijiet xierqa tas-sustanza tat-test fl-atmosfera, grupp ta' kontroll ta' din is-sustanza għandu jiġi użat. Matul dan il-perijodu t'applikazzjoni l-annimali huma osservati ta' kuljum sabiex jiġu skoperti sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu waqt it-test issirilhom nekroskopija, u fit-tmiem tat-test l-annimali li jissopravivu ssirilhom nekroskopija.

1.5. Kriterji tal-kwalità

Xejn.

1.6. Deskrizzjoni tal-metodu tat-test

Preparazzjonijiet

L-annimali huma miżmumin taħt kondizzjonijiet ta' sistemazzjoni u għalf esperimentali għal mill-inqas ħamest ijiem qabel it-test. Qabel it-test annimali żgħar u b'saħħithom huma magħżulin u assenjati lil gruppi ttrattati u gruppi tal-kontroll. Fejn ikun neċessarju, sustanza xierqa tista' tiġi miżjuda mas-sustanza tat-test biex tgħin il-ġenerazzjoni ta' konċentrazzjonijiet xierqa tas-sustanza tat-test fl-atmosfera. Jekk din is-sustanza jew additttivi oħrajn huma użati sAbiex jiffaċilitaw id-dożaġġ, dawn iridu jkunu magħrufa bħala li ma jipproduċux effett tossiku. Data storika tista' tkun użata fejn huwa xieraq.

Kondizzjonijiet tat-test

Annimali esperimentali

Għajr fejn ikun hemm kontra-indikazzjonijiet, il-far huwa l-ispeċ i preferuta. Razez t'annimali żgħar b'saħħithom komunement użati għal-laboratorju għandhom jiġu użati. Fil-bidu tat-test il-limitu tal-varjazzjoniji tal-piżijiet għandha tkun ta' ± 20% tal-piż intermedju. Fejn ikun amministrat test sub-kroniku tal-ġbid fil-pulmun bħala minn studju preliminarju sa studju għal tul ta' żmien, l-istess speċi u razza għandha tintuża fiż-żewġ studji.

Numru u sess

Mill-inqas 20 annimal (10 ta' sess femminili u 10 ta' sess maskili) b'ġilda f'saħħitha għandhom ikunu użati f'kull livell tad-doża. L-annimali tas-sess femminili għandhom ikunu annimali li qatt ma welldu jew li m'humiex inċinta. Jekk hu ppjanat li xi annimali se jkunu ssagrifikati fl-intervall in-numru tagħhom għandu jkun miżjud skond in-numru t'annimali skedat sabiex jiġi ssagrifikat qabel it-terminu ta' l-istudju. B'addizzjoni ma' dan, grupp subordinat ta' 20 annimal (10 annimali għal kull sess) jistgħu jkunu ttrattati b'doża ta' livell qawwi għal 90 ġurnata u osservati għal riversibilità, persistenza jew okkorrenza ttardjata ta' effetti tossiċi għal 28 ġurnata wara t-trattament.

Konċentrazzjonijiet ta' l-esposizzjoni

Mill-inqas tliet konċentrazzjonijiet huma meħtieġa, b'kontroll jew sustanza ta' kontroll (li tikkorrispondi mal-konċentrazzjoni tas-sustanza fl-ogħla livell tagħha) jekk sustanza bħal din hija użata. Għajr għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jiġu ttrattati b'manjiera identika ta' dawk is-soġġetti tal-grupp tat-test. L-iktar konċentrazzjoni qawwija għandha tirriżulta f'effetti tossiċi iżda ma tipproduċi l-ebda, jew ftit, fatalitajiet. Fejn jemm estimazzjoni użabbli ta' esposizzjoni umana l-inqas livell ta' jrid jaqbżu. Idealment, il-konċentrazzjoni intermedja għandha tipproduċi effetti tossiċi osservabbli minimi. Jekk iktar minn konċentrazzjoni waħda intermedja hija użata, il-konċentrazzjonijiet għandhom ikunu spazjati sabiex tiġi prodotta gradazzjoni ta' effetti tossiċi. Fil-gruppi baxxi u intermedji, u fil-gruppi tal-kontroll, l-inċidenza tal-fatalitajiet għandha tkun baxxa, biex tippermetti valutazzjoni sinjifikanti tar-riżultati.

Ħin ta' l-esposizzjoni

Id-dewmien ta' l-esposizzjoni ta' kuljum għandha tkun ta' sitt siegħat wara l-ekwilibrazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-kompartiment. Dewmien ieħor jista' jiġi użat sabiex jilħaq ħtiġijiet speċifiċi.

Tagħmir

L-annimali għandhom jiġu ttestjati f'tagħmir ta' ġbid fil-pulmun magħmul biex iżomm fluss ta' arja dinamiku ta' mill-inqas 12 –il tibdila ta' l-arja għal kull sieġħa sabiex jiġi żgurat kontenut t'ossiġenu adegwat u atmosfera ta' l-esposizzjoni distribwita fl-istess kwalità. Meta kompartiment jiġi użat, irid ikun disinjat b'mod li jnaqqas l-iffullar ta' l-annimali tat-test u jżid l-esposizzjoni tagħhom sal-massimu għall-ġbid tas-sustanza tat-test fil-pulmun. Kompartimenti individwali għal esposizzjoni oro-nażali, għal esposizzjoni tar-ras biss, jew għal esposizzjoni tal-ġisem kollu jistgħu jiġu użati; l-ewwel tnejn inaqsu l-ammont li jinġibed permezz ta' rotot oħrajn.

Perijodu t'osservazzjoni

L-annimali esperimentali għandhom ikunu osservati ta' kuljum għal sinjali ta' tossiċità. Il-ħin tal-mewt u l-ħin li fih jidhru s-sinjali tat-tossiċità għandhom ikunu miżmumin.

Proċedura

L-annimali huma esposti għas-sustanza tat-test ta' kuljum, minn ħames sa' sebat ijiem fil-ġimgħa, għal perijodu ta' 90 ġurnata. Annimali f'xi gruppi subordinati skedati għall-osservazzjonijiet ta' wara għandhom jinżammu għal 28 ġurnata oħra mingħajr trattament sabiex jiġi skopert l-irkupru minn jew il-persistenza ta' l-effetti tossiċi. It-temperatura li fiha t-test huwa magħmul għandha tkun miżmuma għal 22 ± 3 °C. Idealment, l-umdità relattiva għandha tkun miżmuma bejn it-30% u s-70%, iżda f'ċerti sitwazzjonijiet (pereżempju t-test ta' l-ajrusol) dan jista' ma jkunx prattiku. Ikel u xorb għandu jinżamm milli jingħata waqt l-esposizzjoni.

Sistema dinamika ta' ġbid fil-pulmun b'sistema xierqa ta' konċentrazzjoni analitika għandha tiġi użata. Sabiex jiġu stabbiliti l-konċentrazzjonijiet xierqa ta' l-esposizzjoni, test ta' prova huwa rakkomandat. Il-fluss ta' l-arja għandu jkun aġġustat biex jiżgura li l-kondizzjonijiet matul il-kompartiment ta' l-esposizzjoni huwa omoġenu. Is-sistema għandha tiżgura li kondizzjonijiet t'esposizzjoni stabbli huma milħuqa malajr kemm jista' jkun.

Għandhom jiġu magħmulin qjisien jew osservar:

(a) tar-rata tal-fluss ta' l-arja (kontinwament);

(b) tal-konċentrazzjoni attwali tas-sustanza tat-test imkejjla fiż-żona tan-nifs. Matul il-perijodu ta' l-esposizzjoni ta' kuljum il-konċentrazzjoni m'għandhiex tvarja b'iktar minn ± 15% tal-valur intermedju. Iżda fil-każ tat-trabijiet u ta' l-ajrusol, dan il-livell ta' kontroll ma jistax jiġi miksub u marġini usa' jiġu aċċettabbli. Matul id-dewmien totali ta' l-istudju, il-konċentrazzjonijiet minn jum għall-ieħor għandhom jinżammu kostanti daqs kemm huwa prattiku. Matul l-iżvilupp tas-sistema li tiġġenera, analiżi tad-daqs tal-partikoli għandha tkun magħmula biex jiġu stabbiliti l-konċetrazzjonijiet ta' l-ajrusol. Matul l-esposizzjoni, analiżi għandha tiġi magħmula kemm ikun neċessarju sabiex tiġi determinata l-konsistenza tad-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli;

(c) it-temperatura u l-umdità

(d) matul u wara l-esposizzzjoni, osservazzjonijiet għandhom isiru u jiġu mniżżlin sistematikament; informazzjoni individwali għandha tinżamm għal kull annimal. L-annimali kollha għandhom jiġu osservati ta' kuljum u sinjali ta' tossiċità għandhom ikunu miżmuma, inkluż il-ħin ta' l-ewwel attakk, il-grad tagħhom u d-dewmien tagħhom. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-ġilda u fil-fur, fl-għajnejn u fil-membrani mukużi, kif ukoll fis-sistemi respiratorji, ċirkulatorji, awtonomiċi u nervużi ċentrali, fl-attività somatomotorja u fil-mudell ta' komportament. Qjisien tal-konsum ta' l-ikel għandhom jittieħdu ta' kull ġimgħa. osservazzjonijiet regolari ta' l-annimali hwa neċessarju sabiex l-annimali ma jiġux mitlufin mill-istudju minħabba kawżi bħal kannibaliżmu, awtolisi tat-tessuti jew minħabba li jiġu mqegħdin f'post ieħor. Fit-terminu tal-perijodu ta' l-istudju s-sopravissuti fil-gruppi tat-trattament mhux subordinati ssirilhom nekroskopija. Annimali moribondi għandhom jiġu mneħħija u għandha ssirilhom nekroskopija meta jkun avżat.

Dawn l-eżamijiet huma s-soltu magħmulin fuq l-annimali kollha inklużi dawk tal-kontroll:

(a) Eżami oftalmoloġiku, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir addattat ekwivalenti, għandu jiġi magħmul qabel l-esposizzjoni għas-sustanza tat-test u fit-terminu ta' l-istudju, preferibbilment fuq kull animal iżda mill-inqas fuq l-annimali tad-doża qawwija u fuq dawk tal-kontroll. Jekk tibdiliet fl-għajnejn huma skoperti l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati.

(b) Ematoloġija, inklużi l-ematokrit, il-konċentrazzjoni ta' l-emoglobina, il-kwantità ta' l-eritroċit, it-total u d-differenzali tal-kwantità ta' l-eritroċit, u l-qjies tal-potenzal tat-tagħqid tad-demm, bħall-ħin tat-tagħqid, il-ħin tal-protrombin, il-ħin tat-tromboplastin, jew il-kwantità tad-diski ż-żgħar fid-demm, għandhom ikunu nvestigati fit-terminu tal-perijodu tat-test.

(c) Determinazzjoni tal-bijokimika klinika fuq id-demm għandha tkun magħmula fit-terminu tal-perijodu tat-test. Iż-żoni tat-test li huma konsiderati xierqa għall-istudji kollha huma l-bilanċ elettrolit, il-metaboliżmu tal-karboidrati, il-funzjoni tal-fwied u tal-kliewi. Is-selezzjoni ta' testijiet speċifiċi jiġu nfluwenzati b'osservazzhonijiet fuq il-mod t'azzjoni tas-sustanza. Determinazzjonijiet suġġeriti huma l-kalċju, l-fosfru, l-kloru, s-sodj, l-potassju, il-glukosju tas-sawm (b'perijodu ta' sawm addattat għall-ispeċi), transaminat tas-serkum glutamiku pirviku ([1]), transaminat tas-serum glutamiku ożaloċetiku ([2]), dekarbonat ta' l-ornitin, transpeptidu tal-gamma glutamiku, nitroġenu ta' l-urea, albumina, kreatina tad-demm, u t-total tal-qjies tal-proteini tal-bilirubin u tas-serum. Determinazzjonijiet oħrajn li jistgħu jkunu neċessarji għal valutazzjoni xierqa tossikoloġika jinkludu analiżi tal-lipidi, ormoni, bilanċ ta' l-aċidu/alkali, attività metemoglobina u kolìnestera. Bijokimika klinika addizzjonali tista' tkun użata fejn neċessarju biex tiġi estiża l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati.

(d) Analiżi kimika ta' l-awrina m'hijiex meħtieġa fuq bażi ta' rutina iżda hija biss meħtieġa meta hemm indikazzjoni bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata.

Jekk id-data storika tal-linja bażi m'hijiex adegwata, għandha tingħata konsiderazzjoni lid-determinazzjoni tal-parametri tal-bijokimika ematoloġika u klinika qabel ma jibda d-dożaġġ.

Nekroskopija totali

L-annimali kollha għandhom ikunu soġġetti għal nekroskopija totali u sħiħa li tinkludi eżami tas-superfiċje esterna tal-ġisem, ta' kull fetħa tal-ġisem, u tal-ħofor kranjali, toraċiċi u addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-tirojde (bil-paratirojde), u t-testikoli għandhom ikunu peżati friski malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex jiġi evitat li jixxottaw. L-organi u t-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati għal xi eżamijiet istopatoloġiċi futuri possibbli: il-ħsarat kbar fil-ġisem, il-moħħ – inklużi sezzjonijiet tal-medulla/parti ta' l-għerq tal-moħħ li tgħaqqad il-medulla oblongata mat-talamu, il-kortiċi taċ-ċervellett u l-kortiċi celebrali, it-tessut pitwitarju, it-tessut tat-tirojde jew tal-paratirojde, it-tessut tat-timu, (it-trakea), il-pulmuni, il-qalb, l-aorta, il-glandoli tar-rieq, il-fwied, il-milsa, il-kliewi, l-adrenali, il-frixa, il-gonadi, l-utru (l-organi ġenitali aċċessorji), (il-ġilda), il-bużżieqa tal-marrara, l-esofagu, l-istonku, id-duwodenu, il-parti ta' bejn id-duwodenu u l-ilju, l-ilju, il-musrana l-għamja, il-musrana l-ħoxna, ir-rektum, il-bużżieqa ta' l-awrina, il-glandola limfatika rappreżentattiva, (il-glandola tal-ħalib tas-sess femminil), (il-muskolatura tal-koxxa), in-nerv periferali, (l-għajnejn), l-isternu bl-għadam tal-mudullun, (il-wirk, inkluża s-superfiċje artikulari), u (n-nerv li jgħaddi minn ġos-sinsla fuq tliet livelli - ċervikali, toraċiku tan-nofs u tal-ġenbejn). It-tessuti msemmijin fil-parentesi għandhom jiġu eżaminati biss jekk jiġu indikati permezz ta' sinjali ta' tossiċità, jew permezz ta' involviment ta' l-organu li huwa t-targit.

Eżami istopatoloġiku

(a) Istopatoloġija sħiħa għandha tiġi magħmula fuq ġilda normali u ttrattata u fuq l-organi u t-tessuti ta' l-annimali fil-gruppi tal-kontroll u tad-doża qawwija.

(b) Kull ħsara serja għandha tiġi eżaminata.

(c) Organi tat-targit fi gruppi ta' doża oħrajn għandhom jiġu eżaminati.

(d) Il-pulmuni ta' l-annimali fil-gruppi tad-doża baxxi u imtermedji għandhom ukoll ikunu soġġetti għal eżami istopatoloġiku; billi dan jipprovdi valutazzjoni konvenjenti ta' l-istat ta' saħħa ta' l-annimali. Eżami istopatoloġiku iktar fil-fond jita' ma jkunx meħtieġ bħala rutina fuq l-annimali f'dawn il-gruppi, iżda għandu dejjem isir fl-organi li juru evidenza ta' ħsara fil-gruppi ta' doża qawwija.

(e) Meta grupp subordinat huwa użat, l-istopatoloġija għandha tkun magħmula fuq it-tessuti u fuq l-organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi l-oħrajn ittrattati.

([1]) Issa magħrufa bhal serum alanini aminotransferasi
([2]) Issa magħrufa bhal serum aspartate aminotransferasi

2. **DATA**

Id-data għandha tiġi miġbura fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali li kien hemm fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li juru ħsara f'ġisimhom, it-tip ta' ħsara f'ġisimhom u l-persentaġġ ta' l-annimali li juru iż-żewġ tipi ta' ħsara. Ir-riżultati għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' l-istatistika xieraq. Kwalunkwe metodu ta' l-istatistika rikonoxxut jista' jintuża.

3. **RAPPORTAR**

3.1. **Rapport tat-test**

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

— in-nisel ta' l-ispeċi jew ir-razza, minn fejn ġejja l-ispeċi, il-kondizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta,

— il-kondizzjonijiet tat-test:

Deskrizzjoni ta' l-apparat ta' l-esposizzjoni: inkluż id-disinn, tip, dimensjonijiet, minn fejn tidħol l-arja, is-sistema tal-ġenerazzjoni ta' partikoli separati u ajrusol, il-metodu tal-kondizzjonar ta' l-arja, it-trattament ta' l-egżost ta' l-arja u l-metodu ta' l-akkomodazzjoni ta' l-annimali f'kompartimenti tat-tesst meta dawn huma użati. It-tagħmir għat-tkejjil tat-temperatura, umdità u, fejn xieraq, ta' l-istabilità tal-konċentrazzjonijiet ta' l-ajrusol jew id-daqs tal-paartikuli, għandhom jiġu deskritti.

Data ta' l-esposizzjoni: din għandha tkun imqiegħda f'lista u ppreżentata b'valuri intermedji u b'miżura ta' varjabilità (per eżempju d-devjazzjoni ta' l-i*standard*) u għandha tinkludi:

(a) rati tal-fluss ta' l-arja mit-tagħmir tal-ġbid fin-nifs;

(b) temperatura u umdità ta' l-arja;

(c) konċentrazzjonijiet nominali (l-ammont totali tas-sustanza tat-test imqiegħda fit-tagħmir tal-ġbid tan-nifs diviż bil-volum ta' l-arja);

(d) in-natura ta' sustanza oħra, jekk użata;

(e) konċentrazzjonijiet attwali fiż-żona tan-nifs ittestjata;

(f) daqsijiet medjani tal-partikoli (fejn xierqa),

— data tar-rispons tossiku, bis-sess u d-doża,

— il-livell fejn m'hemmx effett, meta possibbli,

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali ssopravivewx sat-tmiem,

— deskrizzjoni ta' effetti tossiċi jew effetti oħrajn (b'attenzjoni partikolari għal skoperti tal-klinika),

— il-ħin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u ż-żmien sussegwenti,

— data ta' l-għalf u tal-piż tal-ġisem,

— skoperti oftalmoloġiċi,

— testijiet ematoloġiċi użati u r-riżultati kollha,

— testijiet tal-bijokimika tal-klinika użati u r-riżultati kollha (inklużi r-riżultati ta' xi analiżi kimika ta' l-awrina),

— skoperti tan-nekroskopija,

— dekrizzjoni dettaljata ta' l-iskoperti istopatoloġiċi kollha,

— trattament ta' l-istatistika tar-riżultati fejn huwa xieraq,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

STUDJU TAT-TERATOĠENIĊITÀ – MAMMALI GERRIEMA U MAMMALI MHUX GERRIEMA

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Definizzjonijiet**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi ta' referenza**

Xejn.

1.4. **Prinċipju tal-metodu tat-test**

Is-sustanza tat-test hija amministrata f'doži gradati, jew f'konċentrazzjonijiet, għal mill-inqas dik il-parti tal-gravidanza li tkopri l-perijodu ta' l-organoġenesi, lil għadd ta' gruppi ta' annimali esperimentali inċinta, b'doża waħda użata għal kull grupp. Ftit qabel id-data tat-twelid mistennija, l-omm għandha tiġi ssagrifikata, l-utru tagħha jiġi mneħħi u l-kontenut tiegħu jiġi eżaminat. Dan il-metodu tat-test ikopri t-tossiċità ta' l-embriju u t-tossiċità tal-fetu.

1.5. **Kriterji ta' kwalità**

Xejn.

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Preparazzjonijiet

Annimali tas-sess femminil verġni żgħar u b'saħħithom ta' età u daqs komparabbli huma akklamatizzati għall-kondizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas ħamest ijiem qabel it-test u wara dawn huma mgħammrin m'annimali tas-sess maskili ta' fertilità stabbilita. Annimali tas-sess femminil inseminati huma magħżulin u assenjati lill-gruppi tat-trattament.

It-tgħammir jista' jkun magħmul jew b'mod naturali jew b'inseminazzjoni artifiċjali. Is-sustanza tat-test hija amministrata ta' kuljum lill-annimali tas-sess femminil minn wara l-implantazzjoni sa ma jasal il-perijodu ta' l-organoġenesi. Ġurnata qabel it-terminu, il-feti huma mwelldin b'isterektomija u eżaminati għal anormalitajiet fil-vixxri jew fl-iskeletru, inklużi ttradjar fl-iżvilupp, ittradjar ta' l-ossifikazzjoni u emorraġiji intestinali.

Kondizzjonijiet tat-test

Annimali esperimentali

L-ispeċi komunement użati huma l-far, il-ġurdien, il-ħamster u l-fenek. L-ispeċi preferuti huma l-far u l-fenek. Razez komunement użati għal-laboratorju għandhom jiġu użati. Ir-razza m'għandux ikollha feċundità baxxa u għandhom ikunu karatterizzati għar-reazzjoni tagħhom għat-teratoġen. L-annimali għandhom jitqiegħdu f'gaġġa individwalment.

Numru u sess

Mill-inqas 20 far, ġurdien jew ħamster inċinta jew 12 –il fenek inċinta huma meħtieġa għal kull livell ta' doża. l-objettiv huwa li jiżgura li huma prodotti numru ta' frieħ suffiċjanti li jippermettu valutazzjoni għall-potenzal teratoġeniku tas-sustanza.

Livelli tad-doża

Mill-inqas tliet livelli tad-doża u livell ta' kontrollgħandhom jiġu użati. Meta s-sustanza tat-test hija amministrata permezz ta' sustanza oħra, grupp ta' kontroll ta' din is-sustanza l-oħra għandu wkoll jiġI użat. Jekk xi sustanza bħal din hija użata, il-propjetajiet tossiċi tagħha għandhom ikunu magħrufa; din is-sustanza m'għandhiex tkun teratoġenika jew li jkollha effetti fuq ir-riproduzzjoni. Għajr għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom ikunu ttrattati b'manjiera identika bħal dawk is-soġġetti tal-grupp tat-test. Jekk ma jkunx hemm limitu minħabba n-natura fiżika/kimika tas-sustanza jew minħabba l-propjetajiet bijoloġiċi tagħha, l-ogħla l-livell tad-doża għandu idealment jinduċi tossiċità materna bħal telf ta' piż, iżda mhux iktar minn 10% ta' mewt materna. Il-livell baxx ta' doża m'għandux jinduċi effetti osservabbli attribwibbli għas-sustanza tat-test. Id-dosa intermedja għandha tkun spazjata ġeometrikament bejn il-livell ta'doża għoli u l-livell ta' doża baxx.

Test tal-limitu

Fil-każ ta' sustanzi ta' tossiċità baxxa, jekk livell ta' doża ta' mill-inqas 1000 mg/kilogramma ma jipproduċix evidenza ta' tossiċità ta' l-embriju jew ta' teratoġeniċità, studji fl-livelli ta' doża oħrajn jistgħu ma jkunux konsiderati neċessarji.

Żmien ta' l-esposizzjoni

Il-ġurnata 0 fit-test hija dik il-ġurnata li fiha huma osservati xi massa vaġinali u/jew sperma (fejn possibbli). Il-perijodu tad-doża għandu jkopri l-perijod ta' organoġenesi maġġura. Dan jista' jiġi meħud bħala l-ġranet 6 sa 15 għal-far u l-ġurdien, 6 sa 14 għall-ħamster, jew 6 sa 18 għall-fenek. Jekk il-ġurnata 0 hija bbażata fuq osservazzjoni tat-tagħmir jew inseminazzjoni artifiċjali, iż-żmien li ssemma għandu jkun aġġustat billi tiġi miżjuda ġurnata. Jew, bħala alternattiva, il-perijodu tad-dożagg jista' jiġi estiż għal bejn wieħed u ieħor ġurnata qabel id-data tat-twelid mistennija.

Perijodu t'osservazzjoni

Eżami kliniku bir-reqqa għandu jiġi magħmul mill-inqas darba kuljum. Osservazzjonijiet addizzjonali għandhom jiġu magħmula ta' kuljum b'azzjonijiet xierqa meħuda sabiex inaqqsu t-telf ta' l-annimali matul l-istudju.

Proċedura

Is-sustanza tat-test hija amministrata mill-ħalq. Is-sustanza tat-test għandha tiġi amministrata bejn wieħed u ieħor ta' kuljum fl-istess ħin tal-ġurnata.

L-annimali tat-test tas-sess femminil għandhom ikunu ttrattati bis-sustanza tat-test ta' kuljum matul il-perijodu ta' trattament. Id-doża tista' tkun ibbażata fuq il-piż ta' dawn l-annimali fil-bidu ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza, jew, bħala alternattiva, skond iż-żieda rapida fil-piż li sseħħ waqt il-gravidanza, l-annimali jistgħu jkunu peżati perijodikament u d-doża tiġi bbażata fuq l-iktar determinazzjoni ta' piż riċenti. Sinjali ta' tossiċità għandhom jiġu mniżżlin hekk kif kienu osservati, inkluż bil-ħin ta' l-ewwel attakk, il-grad u d-dewmien. L-annimali tas-sess femminil li juru sinjali t'abort jew twelid prematur għandhom ikunu ssagrifikati u soġġetti għal eżami makroskopiku. Il-perijodu t'osservazzjoni ta' wara t-trattament għandu jkompli sa bejn wieħed u ieħor ġurnata qabel it-terminu; l-objettiv huwa li jiġi kopert ħafna mill-perijodu ta' gravidanza iżda għandha tiġi evitata l-interpretazzjoni tar-riżultati kkomplikata li tista' sseħħ fejn ikun hemm twelid naturali. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu, iżda mhux limitati għal, tibdil fil-ġilda u fil-fur, fl-għajnejn u fil-membrani mukuża, kif ukoll fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċI u nervuża ċentrali, l-attività somatomotorja u fil-mudell ta' mġieba. Qjisien għandhom jittieħdu ta' kull ġimgħa tal-konsum ta' l-ikel. L-annimali għandhom jiġu peżati ta' kull ġimgħa.

Nekroskopija

Fil-mewt matul, jew fit-terminazzjoni ta' l-istudju l-omm għandha tiġi eżaminata makroskopikament għal xi anormalitajiet strutturali jew tibdil patoloġiku li setgħu influwenzaw il-gravidanza. Immedjatament wara l-mewt, l-utru għandu jiġi mheħħi u l-kontenut tiegħu għandu jiġi eżaminat għall-mewt ta' l-embriju jew tal-fetu u għan-numru tal-feti ħajjin. Huwa s-soltu possibbli li l-ħin tal-mewt *in utero* jiġi esstimat meta dan ikun ġara. Fil-firien u fil-fniek in-numru tal-*corpora lutea* jista' jiġi determinat. Is-sess tal-feti għandu jiġi determinat u dawn għandhom jiġu peżati individwalment, u l-piż huwa mniżżel, u l-piż intermedju tal-feti għandu jiġi derivat. Wara t-tneħħija tal-feti mill-utru, kull wieħed mill-feti għandu jiġi eżaminat esternament. Għall-firien, ġrieden u ħamsters, minn terz sa nofs kull boton għandu jiġi ppreparat u eżaminat għal anomaliji skeletali u l-parti li tibqa' minn dak il-boton għandha tiġi ppreparata u eżaminata għal anomaliji fit-tessuti r-rotob permezz ta' metodi xierqa. Għall-fniek, kull wieħed mill-feti għandu jiġi eżaminat permezz ta' dissezzjoni bir-reqqa għal anormalitajiet fil-vixxri u wara għandu jiġi eżaminat għal anomaliji skeletali.

2. **DATA**

Id-data għandha tiġi miġbura fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali li kien hemm fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li kienu inċinta, in-numru u l-persentaġġI tal-feti ħajjin u tal-feti b'xi anormalitajiet fit-tessuti r-rotob jew b'xi anormalitajiet skeletali u r-relazzjonijiet tagħhom mal-boton speċifiku. Ir-riżultati għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' l-istatistika xieraq. Kwalunkwe metodu ta' l-istatistika rikonoxxut jista' jintuża.

3. **RAPPORTAR**

3.1. **Rapport tat-test**

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

— in-nisel ta' l-ispeċi jew ir-razza, minn fejn ġejja l-ispeċi, il-kondizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta,
— il-kondizzjonijiet tat-test,
— il-livelli tad-doża (inkluża xi sustanza, jekk użata) u konċentrazzjonijiet,
— data tar-rispons tossiku, bid-doża,
— il-livell fejn m'hemmx effett, meta possibbli,
— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali ssopravivewx sat-tmiem,
— deskrizzjoni ta' effetti tossiċi jew effetti oħrajn,
— il-ħin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u ż-żmien sussegwenti,
— data ta' l-għalf u tal-piż tal-ġisem,
— dewmien tal-gravidanza u d-data tal-boton (inkluża data storika),
— data tal-fetu (ħaj/mejjet, sess, difetti fit-tessuti r-rotob u difetti skeletali),
— tal-boton (ħajjin/mejtin, sess, difetti fit-tessuti r-rotob u difetti skeletali ta' kull boton),
— - trattament statistiku tar-riżultati,
— diskussjoni tar-riżultati,
— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ KRONIKA

1. METODU

1.1. Introduzzjoni

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. Definizzjonijiet

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. Sustanzi ta' referenza

Xejn

1.4. Prinċipju tal-metodu tat-test

Is-sustanza tat-test hija amministrata normali, sebat ijiem fil-ġimgħa, permezz ta' rotta xierqa, lil għadd ta' gruppi t'annimali esperimentali, doża waħda għal kull grupp, għal porzjon prinċipali tat-tul tal-ħajja tagħhom. Matul u wara l-esposizzjoni, l-annimali esperimentali huma osservati ta' kuljum sabiex jiġu skoperti sinjali ta' tossiċità.

1.5. Kriterji ta' kwalità

Xejn.

1.6. Deskrizzjoni tal-metodu tat-test

Preparazzjonijiet

L-annimali huma miżmuma taħt kondizzjonijiet t' akkomodazzjoni u għalf esperimentali għal mill-inqas ħamest ijiem qabel it-test. Qabel it-test, annimali żgħar u b'saħħithom huma magħżulin u assenjati lil gruppi ttrattati u lill-gruppi tal-kontroll.

Kondizzjonijiet tat-test

Annimali esperimentali

L-ispeċI preferuta hija l-far. Jekk ikun hemm bażi ta' riżultati ta' studji magħmulin qabel, speċi oħrajn (mammali gerriema jew dawk mhux gerriema) jistgħu jiġu użati. Razez t'annimali żgħar u b'saħħithom komunement użati fil-laboratorju għandhom ikunu użati u d-dożaġġ għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara l-ftim.

Fil-bidu ta' l-istudju il-varjazzjoni tal-piż fl-annimali m'għandhiex taqbeż l-± 20% tal-valur intermedju. Fejn jiġi magħmul test sub-kroniku orali bħala minn studju preliminarju sa studju fit-tul, l-istess speċi/nisel u razza għandhom jiġu użati fiż-żewġ studji.

Numru u sess

Għall-mammali gerriema mill-inqas 40 annimal (20 tas-sess femminil u 20 tas-sess maskil) għandhom jiġu użati f'kull livell ta' doża u fil-grup tal-kontroll konkorrenti. L-annimali tas-sess femminili għandhom ikunu dawk li qatt ma welldu jew li ma jkunux inċinta. Jekk huma ppjanati sagrifiċċji fl-intervall, in-numru għandu jiżdied bin-numru t'annimali skedati sabiex jiġu ssagrifikati qabel ma jkun lest l-istudju.

Għall-mammali mhux gerriema numru iżgħar t'annimali, iżda mill-inqas erba' għal kull sess għal kull grupp, huwa aċċettabbli.

Livelli tad-doża u frekwenza ta' l-esposizzjoni

Mill-inqas tliet livelli għandhom jiġu użati b'żieda mal-grupp tal-kontroll konkorrenti. L-ogħla livell tad-doża għandu jislet sinjali definittivi ta' tossiċità li tikkawża l-mewt eċċessiva. Il-livell baxx tad-doża m'għandux jipproduċi evidenza ta' tossiċità.

Id-doża intermedja għandha tiġi stabbilita fil-marġini tan-nofs bejn id-dożi l-għoljin u d-dożi l-baxxi.

Is-selezzjoni tal-livelli tad-doża għandha tieħu in konsiderazzjoni d-data minn testijiet u studji ta' tossiċità preċedenti.

Il-frekwenza ta' l-esposizzjoni hija normalment ta' kuljum. Jekk il-kimika hija amministrata fl-ilma tax-xorb jew imħallta fid-dieta din għandha tkun ipprovduta kontinwament.

Kontrolli

Grupp ta' kontroll konkorrenti li huwa identiku f'kull aspett għall-gruppi ttrattati, għajr għall-esposizzjoni għas-sustanza tat-test, għandu jiġi użat.

F'ċirkostanzi speċjali, bħal fi studji ta' ġbid fin-nifs li jinvolvu l-ajrusol jew l-użu t'emulsjonant t'attività bijoloġika mhux karatterizzata fi studji orali, grupp ta' kontroll negattiv konkorrenti għandu wkoll jiġi użat. Il-grupp ta' kontroll negattiv huwa ttrattat fl-istess manjiera bħal dik tal-gruppi tat-test għajr li l-annimali mhumiex esposti għas-sustanza tat-test jew għal xi sustanza oħra.

Rotta ta' l-amministrazzjoni

Iż-żewġ rotot t'amministrazzjoni ewlenin huma l-ħalq u n-nifs. L-għażla tar-rotta t'amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tas-sustanza tat-test u mir-rotta lit kun t'esposizzjoni fl-umani.

L-użu tar-rotta dermali tipperżenta problemi prattiċi konsiderevoli. Tossiċità sistemika kronika li tirriżulta mill-assorbiment minn ġol-ġilda tista' tkun normalment dedotta mir-riżultati ta' test orali ieħor u mit-tagħrif ta' kemm ikun hemm assorbiment minn ġol-ġilda derivati minn testijiet għat-tossiċità ġol-ġilda preċedenti.

Studji orali

Meta s-sustanza tat-test hija assorbita mill-apparat gastrointestinali, u jekk ir-rotta ta' l-inġestjoni hija waħda li biha l-umani jistgħu jiġu esposti, ir-rotta orali ta' l-amministrazzjoni hija preferuta jekk m'hemmx kontra-indikazzjonijiet.

:-annimali jistgħu jirċievu s-sustanza tat-test fid-dieta, imdewwba fl-ilma tax-xorb jew mogħtija permezz ta' kapsula.

Idealment id-dożaġġ ta' kuljum fuq bażi ta' sebat ijiem fil-ġimgħa għandu jiġi użat minħabba li dożaġġ fuq bażi ta' ħamest ijiem fil-ġimgħa jista' jippermetti rkupru jew irtirar tat-tossiċità fil-perijodu li ma tkunx qed tiġi amministrata d-doża u b'hekk jiġI affettwat ir-riżultat u il-valutazzjoni sussegwenti. iżda, dożaġġ fuq bażi ta' ħamest ijiem fil-ġimgħa huwa kkunsidrat bħala aċċettabbli jekk wieħed jibbaża fuq konsiderazzjonijiet prattiċi.

Studji ta' ġbid fin-nifs

Peress li l-istudji tal-ġbid fin-nifs jippreżentaw problemi tekniċi ta' komplessità ikbar mir-rotot t'amministrazzjoni l-oħrajn, direzzjoni iktar dettaljata fuq dan il-mod t'amministrazzjoni hija mogħtija hawnhekk. Wieħed għandu wkoll jinnota li istillazzjoni intratrakeali tista' tikkostitwixxi alternattiva valida f'sitwazzjonijiet speċifiċi.

Esposizzjonijiet għal tul ta' żmien huma s-soltu mmudellati fuq esposizzjonijiet umani pproġettati, u l-annimali jingħataw jew esposizzjoni ta' kuljum ta' sitt sigħat wara l-ekwilibrazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-kompartimenti, għal ħamest ijiem fil-ġimgħa (esposizzjoni intermittenti), jew, relevanti għal esposizzjoni possibbli ta' l-ambjent, 22 sa 24 sigħat t'esposizzjoni għal kull jum għal sebat ijiem fil-ġimgħa (esposizzjoni kontinwa), b'bejn wieħed u ieħor sigħa biex jingħata l-għalf lill-annimali kuljum f'ħin simili u manteniment tal-kompartiment. Fiż-żewġ każijiet, l-annimali huma s-soltu esposti għal konċentrazzjonijiet fissi tas-sustanza tat-test. Differenza prinċipali bejn l-esposizzjoni intermittenti u l-esposizzjoni kontinwa hija dik li f'ta' l-ewwel hemm perijodu ta' 17 sa 18 –il sigħa li fih l-annimali jistgħu jirkupraw mill-effetti ta' l-esposizzjoni ta' kuljum, b'perijodi iktar twal ta' rkupru matul tmiem il-ġimgħa.

L-għażla t' esposizzjoni intermittenti jew kontinwa tiddependi fuq l-objettivi ta' l-istudju u fuq l-esposizzjoni umana li tiġi simulata. Iżda, ċerti diffikultajiet tekniċi għandhom jiġu kkunsidrati. Per eżempju, il-vantaġġi t'esposizzjoni kontinwa għas-simulazzjoni ta' kondizzjonijiet ambjentali tista' tiġi bbilanċjata bin-neċessità għall-ilma u l-għalf waqt l-esposizzjoni, u bil-bżonn għal iktar ġenerazzjoni kkumplikata (iżda li tkun iktar ta' min jafdaha) t'ajrusol u ta' fwar u ta' tekniċi ta' sorveljar.

Kompartimenti ta' l-esposizzjoni

L-annimali għandhom jiġu ttestjati f'kompartimenti għall-ġbid fin-nifs disinnati sabiex iżommu fluss dinamiku ta' mill inqas 12 –il bidla fl-arja għal kull sigħa biex b'hekk jiġi żgurat kontenut adegwat t'ossiġenu u atmosfera t'esposizzjoni li tkun distribwita fl-istess ammont. Il-kompartimenti tal-kontroll u ta' l-esposizzjoni għandhom ikunu identiċi fil-kostruzzjoni u disinnati biex jiżguraw kondizzjonijiet t'esposizzjoni komparabbli f'kull rispett għajr fl-esposizzjoni għas-sustanza tat-test. Presssjoni ftit negattiva ġewwa l-kompartiment hija ġeneralment miżmuma biex tipprevjeni telf tas-sustanza tat-test fiż-żona tal-madwar. Il-kompartimenti għandhom inaqqsu l-iffullar ta' l-annimali tat-test. Bħala regola ġenerali, sabiex tiġi żgurata l-istabilità ta' l-atmosfera tal-kompartiment, il-volum totali ta' l-annimali tat-test m'għandhiex taqbeż il-5% tal-volum tal-kompartiment.

Għandhom jiġu magħmulin qjisien jew osservar:

(i) tal-fluss ta' l-arja: ir-rata tal-fluss ta' l-arja mill-kompartiment għandha tkun preferibbilment sorveljata kontinwament.

(ii) tal-konċentrazzjoni: Matul il-perijodu ta' l-esposizzjoni ta' kuljum il-konċentrazzjoni m'għandhiex tvarja b'iktar minn ± 15% tal-valur intermedju.

(iii) tat-temperatura u l-umdità: għall-mammali gerriema, it-temperatura għandha tinżamm fi 22 ± 2 °C, u l-umdità fil-kompartiment fi 30 sa 70%, għajr fejn l-ilma huwa użat fis-sustanza tat-test fl-atmosfera tal-kompartiment. Preferibbilment dawn it-tnejn għandhom jiġu ssorveljati kontinwament;

(iv) tal-qjisien tad-daqs tal-partikoli: id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli għandha tiġi ddeterminata fl-atmosferi tal-kompartimenti li tinvolvi ajrusol likwidu jew solidu. Il-partikoli ta' l-ajrusol għandhom ikunu ta' daqs respirabbli għad-daqs ta' l-annimali użati. Kampjuni ta' l-atmosferi tal-kompaartimenti għandhom jiġu meħuda fiż-żona tan-nifs ta' l-annimali. Il-kampjun ta' l-aarja għandu jkun rappreżentattiv tad-distribuzzjoni taal-paartikuli li għalihom l-annimali huma esposti u għandhom jagħmlu tajjeb, fuq bażi gravimetrika, għall-ajrusol anke fejn ħafna mill-ajrusol ma kienx respirabbli. Analiżi tad-daqs tal-partikoli għandha tiġI magħmula frekwentement matul l-iżvilupp tas-sistema ġenerarja biex tiżgura l-istabilità ta' l-ajrusol u minn hemm 'il quddiem, daqs kemm ikun neċessarju matul l-esposizzjonijiet biex tiġI determinate adegwatament il-konsistenza tad-distribuzzjoni tal-partikoli li għalihom l-annimali kienu ġew esposti.

Dewmien ta' l-istudju

Id-dewmien tal-perijodu ta' l-amministrazzjoni għandu jkun mill-inqas 12 –il xahar.

Proċedura

Osservazzjonijiet

Eżaminazzjoni tal-klinika bir-reqqa għandha tiġi magħmula mill-inqas darba kuljum. Osservazzjonijiet addizzjonali għandhom jiġu magħmulin ta' kuljum b'azzjonijiet xierqa meħuda sabiex inaqqsu t-telf ta' l-annimali mill-istudju, per eżempju, nekroskopija jew tkessiħ ta' dawk l-annimali li nstabu mejtin u iżolazzjoni jew sagrifikazzjoni ta' l-annimali debboli jew moribondi. Osservazzjonijiet bir-reqqa għandhom jiġu magħmulin sabiex jiġu osservati l-ewwel attakki ta' l-effetti tat-tossiċità u l-progressjoni tagħhom kif ukoll sabiex jitnaqqaas it-telf minħabba mard, awtoloż jew kannibaliżmu.

Sinjali kliniċi, inklużi tibdiliet newroloġiċi u okulari kif ukoll il-mewt, għandhom jiġu mniżżlin għal kull animal. Il-ħin ta' l-ewwel attak u l-progressjoni tal-kondizzjonijiet tossiċi, inklużu tumuri suspettati, għandhom jiġu mniżżlin.

Il-piż tal-ġisem għandu jiġi mniżżel individwalment għal kull animal darba f'ġimgħa matul l-ewwel 13 –il ġimgħa tal-perijodu tat-test u mill-inqas darba kull erba' ġimgħat minn hemm 'il quddiem. Il-konsum ta' l-ikel għandu jiġI determina darba f'ġimgħa matul l-ewwel 13 –il ġimgħa ta' l-istudju, u wara f'intervalli ta' tliet xhur jekk l-istat ta' saħħa jew it-tibdiliet fil-piż ma jiddettawx mod ieħor.

Eżami ematoloġiku

Eżami ematoloġiku (per eżempju l-kontenut ta' l-emoglobina, il-volum taċ-ċelloli, it-total taċ-ċelloli ħomor tad-demm, it-total taċ-ċelloli bojod tad-demm, id-diski żgħar tad-demm u l-miżuri l-ohrajn tal-potenzal tat-tgħaqqid tad-demm) għandu jiġi magħmul f'intervalli ta' tliet xhur, sitt xhur u minn hemm 'il quddiem f'bejn wieħed u ieħor sitt xhur interval u fit-terminu fuq kampjuni tad-demm miġburin mill-mammali mhux gerriema u minn 10 firien/sess ta' kull grupp.

Jekk ikun possibbli, il-kapjuni għandhom ikunu mill-istess firien f'kull interval. B'addizzjoni ma' dan, kampjun ta' qabel it-test għandu jiġi meħud mill-mammali mhux gerriema.

Jekk l-osservazzjonijiet kliniċI juru deterjorament fis-saħħa ta' l-annimali matul l-istudju, kwantità differenzali ta' demm hija magħmula għall-gruppi iktar baxxi li jkun imiss biss jekk hemm diskrepanza kbira bejn l-ogħla grupp u l-gruppi tal-kontroll, jew jekk dan hwa ndikat bi skoperti patoloġiċi.

Analiżi kimika ta' l-awrina

Kampjuni ta' l-awrina minn kull mammalu mhux gerriemi u minn 10 firien/sess mill-gruppi kollha, jekk possibbli minn dawk l-istess firien fl-istess interval bħal fl-eżami ematoloġiku, għandhom jiġu miġbura għall-analiżi. dawn id-determinazzjonijiet li ġejjin għandhom jiġu magħmula jew minn annimali individwali jew fuq kampjun ta' mammali gerriema ta' l-istess sess u grupp:

— apparenza: volum u densità għall-annimali individwali,

— proteini, glukosju, ketoni, demm (semi-kwantitattivi),

— mikroskopija tas-sediment (semi-kwantitattiva)

Kimika tal-klinika

F'intervalli ta' bejn wieħed u ieħor sitt xhur u fit-terminu, kampjuni tad-demm huma meħuda għall-qjisien tal-kimika tal-klinika minn kull mammalu mhux gerriem u minn 10 firien/sess minn kull grupp, jekk possibbli, mill-istess firien f'kull interval. B'addizzjoni ma' dan, kampjun ta' qabel it-test għandu jiġi miġbur mill-mammali mhux gerriema. Il-plażma hija ppreparata minn dawn il-kampjuni u d-determinazzjonijiet li ġejjin għandhom jiġu magħmulin:

— it-total tal-konċentrazzjoni tal-proteini,

— il-konċentrazzjoni ta' l-albumina,

— testijiet tal-funzjoni tal-fwied (bħal l-attività tal-fosfat ta' l-alkalina, l-attività tat-transaminat piruviku glutamiku [1] u l-attività tat-transaminat tas-serum glutamiku ożaloċetiku [2]), transpeptidu tal-gamma glutamiku, dekarbonat ta' l-ornitin,

— metaboliżmu tal-karboidrat bħal dak tal-glukosju tas-sawm,

— testijiet tal-funzjoni tal-kliewi bħad-demm tan-nitroġenu ta' l-urea.

Nekroskopija totali

Nekroskopija totali u sħiħa għandha tiġi magħmula fuq l-annimali kollha, inklużi fuq dawk li mietu matul l-esperiment jew dawk li ġew maqtula meta ġew misjuba f'kondizzjoni moribonda. Qabel is-sagrifikazzjoni, kampjuni tad-demm għandhom jiġu miġbura mill-annimali kollha, għall-kwantitajiet differenzali tad-demm. Il-ħsarat kollha visibbli, it-tumuri jew il-ħsarat suspettati li jkunu tumuri għandhom jiġu ppreservati. Wieħed għandu jipprova jirrelata l-osservazzjonijiet ma' l-iskoperti mikroskopiċi.

L-organi u t-tessuti kollha għandhom jiġu ppreservati għal eżami istopatoloġiku. Dan is-soltu jikkonċerna l-organi u t-tessuti li ġejjin: il-moħħ [3] (sezzjonijiet tal-medulla/parti ta' l-għerq tal-moħħ li tgħaqqad il-medulla oblongata mat-talamu, il-kortiċi taċ-ċervellett u l-kortiċi celebrali), it-tessut pitwitarju, it-tessut tat-tirojde (inkluż tal-paratirojde), it-tessut tat-timu, il-pulmuni (inkluża t-trakea), il-qalb, l-aorta, il-glandoli tar-rieq, il-fwied [3], il-milsa, il-kliewi [3], l-adrenali [3], l-esofagu, l-istonku, id-duwodenu, il-parti ta' bejn id-duwodenu u l-ilju, l-ilju, il-musrana l-għamja, il-musrana l-ħoxna, ir-rektum, il-frixa, il-gonadi [3], l-utru, l-organi ġenitali aċċessorji, il-glandola tal-ħalib tas-sess femminil, il-ġilda, il-muskolatura, in-nerv periferali, in-nerv li jgħaddi minn ġos-sinsla fuq tliet livelli - ċervikali, toraċiku tan-nofs u tal-ġenbejn, l-isternu bl-għadam tal-mudullun u l-għajnejn. In-nefħa tal-pulmuni u tal-bużżieqa ta' l-awrina b'fissattiv huwa l-mezz ottimali li jippreserva dawn it-tessuti; in-nefħa tal-pulmuni fi studji tal-ġbid fin-nifs hija essenzali għal eżami istopatoloġiku xieraq. Fi studji speċjali bħal dawk tal-ġbid fin-nifs, l-apparat respiratorju kollu għandu jiġI studjat, inkluż l-imnieħer, il-farinġI u l-larinġi.

Jekk eżamijiet kliniċi oħrajn huma magħmula, l-informazzjoni ottenuta minn dawn il-proċeduri għandha tkun għad-disposizzjoni qabel l-eżami mikroskopiku, minħabba li din tista' tagħti direzzjoni sinjifikanti lill-patoloġista.

Istopatoloġija

It-tibdiliet kollha visibbli, partikolarment it-tumuri u ħsarat oħrajn li jseħħu fi kwalunkwe organu għandhom jiġu eżaminati mikroskopikament. B'żieda ma' dan, dawn il-proċeduri li ġejjin huma rakkomandati:

(a) Eżami mikroskopiku ta' kull organu u tessut ippreservat b'deskrizzjoni kompleta tal-ħsarat li nstabu:

1. Fl-annimali kollha li mietu jew ġew maqtula matul l-istudju;

2. fl-annimali kollha tal-grupp tad-doża għolja u tal-gruppi tal-kontroll;

(b) Organi u tessuti li juru anormalitajiet ikkawżati, jew possibilment ikkawżati, bis-sustanza tat-test huma wkoll eżaminati fil-gruppi tad-doża baxxa;

(c) Fejn ir-riżultat tat-test jagħti evidenza ta' tnaqqis sostanzjali fit-tul ta' ħajja normali ta' l-annimal jew ta' l-induzzjoni ta' l-effetti li jistgħu jaffettwaw reazzjoni tossika, id-doża baxxa li jkun imiss għandha tiġI eżaminata kif deskritt hawn fuq;

(d) Informazzjoni dwar l-inċidenza ta' ħsara li sseħħ normalment fir-razza ta' l-annimali użati, taħt l-istess kondizzjonijiet tal-laboratorju, jiġifieri data tal-kontroll storika, hija indispensabbli għall-istima korretta tas-sinjifikanza tat-tibdil osservat fl-annimali ttrattati.

(1) Issa magħrufa bhal serum alanini aminotransferasi
(2) Issa magħrufa bhal serum aspartate aminotransferasi
(3) Dawn l-organi, minn g]axar annimali g]al kull sess g]all kull grupp g]al mammali gerriema u g]all mammali kollha li mhumiex gerriema, flimkien mat-tirojde (bil-paratirojde) g]all kull mammalu mhux gerriemi, g]andhom ji[u pe\ati.

2. **DATA**

Id-data għandha tiġi miġbura fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali li kien hemm fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li juru ħsara f'ġisimhom, it-tip ta' ħsara f'ġisimhom u l-persentaġġ ta' l-annimali li juru iż-żewġ tipi ta' ħsara. Ir-riżultati għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' l-istatistika xieraq. Kwalunkwe metodu ta' l-istatistika rikonoxxut jista' jintuża.

3. **RAPPORTAR**

3.1. **Rapport tat-test**

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

— in-nisel ta' l-ispeċi jew ir-razza, minn fejn ġejja l-ispeċi, il-kondizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta,

— il-kondizzjonijiet tat-test:

Deskrizzjoni ta' l-apparat ta' l-esposizzjoni:

inkluż id-disinn, tip, dimensjonijiet, minn fejn tidħol l-arja, is-sistema tal-ġenerazzjoni ta' partikoli separati u ajrusol, il-metodu tal-kondizzjonar ta' l-arja, it-trattament ta' l-egżost ta' l-arja u l-metodu ta' l-akkomodazzjoni ta' l-annimali f'kompartimenti tat-test meta dawn huma użati. It-tagħmir għat-tkejjil tat-temperatura, umdità u, fejn xieraq, ta' l-istabilità tal-konċentrazzjonijiet ta' l-ajrusol jew id-daqs tal-paartikuli, għandhom jiġu deskritti.

Data ta' l-esposizzjoni:

din għandha tkun imqiegħda f'lista u ppreżentata b'valuri intermedji u b'miżura ta' varjabilità (per eżempju d-devjazzjoni ta' l-is*tandard*) u għandha tinkludi:

(a) rati tal-fluss ta' l-arja mit-tagħmir tal-ġbid fin-nifs;

(b) temperatura u umdità ta' l-arja;

(c) konċentrazzjonijiet nominali (l-ammont totali tas-sustanza tat-test imqiegħda fit-tagħmir tal-ġbid tan-nifs diviż bil-volum ta' l-arja);

(d) in-natura ta' sustanza oħra, jekk użata;

(e) konċentrazzjonijiet attwali fiż-żona tan-nifs ittestjata;

(f) daqsijiet medjani tal-partikoli (fejn xierqa),

— il-livelli tad-doża (inkluża xi sustanza, jekk użata) u konċentrazzjonijiet,

— data tar-rispons tossiku, bis-sess u d-doża,

— il-livell fejn m'hemmx effett,

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali ssopravivewx sat-tmiem,

— deskrizzjoni ta' effetti tossiċi jew effetti oħrajn,

— il-ħin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u ż-żmien sussegwenti,

— data ta' l-għalf u tal-piż tal-ġisem,

— skoperti oftalmoloġiċi,

— testijiet ematoloġiċi użati u r-riżultati kollha,

— testijiet tal-bijokimika tal-klinika użati u r-riżultati kollha (inklużi r-riżultati ta' xi analiżi kimika ta' l-awrina),

— skoperti tan-nekroskopija,

— dekrizzjoni dettaljata ta' l-iskoperti istopatoloġiċi kollha,

— trattament ta' l-istatistika tar-riżultati fejn huwa possibbli,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

TEST TAL-KARĊINOĠENIĊITÀ

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Definizzjonijiet**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi ta' referenza**

Xejn

1.4. **Prinċipju tal-metodu tat-test**

Is-sustanza tat-test hija amministrata normali, sebat ijiem fil-ġimgħa, permezz ta' rotta xierqa, lil għadd ta' gruppi t'annimali esperimentali, doża waħda għal kull grupp, għal porzjon prinċipali tat-tul tal-ħajja tagħhom. Matul u wara l-esposizzjoni, l-annimali esperimentali huma osservati ta' kuljum sabiex jiġu skoperti sinjali ta' tossiċità.

1.5. **Kriterji ta' kwalità**

Xejn.

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

L-annimali huma miżmuma taħt kondizzjonijiet t' akkomodazzjoni u għalf esperimentali għal mill-inqas ħamest ijiem qabel it-test. Qabel it-test, annimali żgħar u b'saħħithom huma magħżulin u assenjati lil gruppi ttrattati u lill-gruppi tal-kontroll.

Annimali esperimentali

Jekk ikun hemm bażi ta' riżultati ta' studji magħmulin qabel, speċi oħrajn (mammali gerriema jew dawk mhux gerriema) jistgħu jiġu użati. Razez annimali żgħar u b'saħħithom komunement użati fil-laboratorju għandhom ikunu użati u d-dożaġġ għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara l-ftim.

Fil-bidu tat-test il-limitu tal-varjazzjoniji tal-piżijiet għandha tkun ta' ± 20% tal-piż intermedju. Fejn ikun amministrat test sub-kroniku tal-ġbid fil-pulmun bħala minn studju preliminarju sa studju għal tul ta' żmien, l-istess speċi u razza għandha tintuża fiż-żewġ studji.

Numru u sess

L-annimali tas-sess femminili għandhom ikunu dawk li qatt ma welldu jew li ma jkunux inċinta. Jekk huma ppjanati sagrifiċċji fl-intervall, in-numru għandu jiżdied bin-numru t'annimali skedati sabiex jiġu ssagrifikati qabel ma jkun lest l-istudju.

Livelli tad-doża u frekwenza ta' l-esposizzjoni

Mill-inqas tliet livelli għandhom jiġu użati b'żieda mal-grupp tal-kontroll konkorrenti. L-ogħla livell tad-doża għandu jislet sinjali minimi ta' tossiċità, bħal tnaqqis fil-piż tal-ġisem (ta' inqas minn 10%), mingħajr ma jbiddlu sostanzjalment it-tul tal-ħajja minħabba xi effetti għajr it-tumuri.

L-iktar livell baxx tad-doża m'għandux jinterferixxi mal-kobor normali, ma' l-żvilupp u ma' l-għomor ta' l-annimal jew jipproduċI x'indikazzjonijiet ta' tossiċità. Ġeneralment, dan m'għandux ikun iktar baxx minn 10% tad-doża l-għolja.

Id-doża intermedja għandha tiġI stabbilita fil-marġini tan-nofs bejn id-dożi l-għoljin u d-dożi l-baxxi.

Is-selezzjoni tal-livelli tad-doża għandha tieħu in konsiderazzjoni d-data minn testijiet u studji ta' tossiċità preċedenti.

Il-frekwenza ta' l-esposizzjoni hija normalment ta' kuljum. Jekk il-kimika hija amministrata fl-ilma tax-xorb jew imħallta fid-dieta din għandha tkun ipprovduta kontinwament.

Kontrolli

Grupp ta' kontroll konkorrwnti li huwa identiku f'kull aspett għall-gruppi ttrattati, għajr għall-esposizzjoni għas-sustanza tat-test, għandu jiġi użat.

F'ċirkostanzi speċjali, bħal fi studji ta' ġbis fin-nifs li jinvilvu l-ajrusol jew l-użu t'emulsjonant t'attività bijoloġika mhux karatterizzata fi studji orali, grupp ta' kontroll negattiv konkorrenti għandu wkoll jiġI użat. Il-grupp ta' kontroll negattiv huwa ttrattat fl-istess manjiera bħal dik tal-gruppi tat-test għajr li l-annimali mhumiex esposti għas-sustanza tat-test jew għal xi sustanza oħra.

Rotta ta' l-amministrazzjoni

It-tliet rotot ewlenin t'amministrazzjoni huma l-ħalq, il-ġilda u n-nifs. L-għażla tar-rotta t'amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċI fiżiċI u kimiċI tas-sustanza tat-test u mir-rotta lit kun t'esposizzjoni fl-umani.

The use of the dermal route presents considerable practical problems. Chronic systemic toxicity resulting from percutaneous absorption can normally be inferred form the results of another oral test and a knowledge of the extent of percutaneous absorption derived from preceding percutaneous toxicity tests.

Studji orali

Meta s-sustanza tat-test hija assorbita mill-apparat gastrointestinali, u jekk ir-rotta ta' l-inġestjoni hija waħda li biha l-umani jistgħu jiġu esposti, ir-rotta orali ta' l-amministrazzjoni hija preferuta jekk m'hemmx kontra-indikazzjonijiet. L-annimali jistgħu jirċievu s-sustanza tat-test fid-dieta, imdewwba fl-ilma tax-xorb jew mogħtija permezz ta' kapsula.

Idealment id-dożaġġ ta' kuljum fuq bażi ta' sebat ijiem fil-ġimgħa għandu jiġi użat minħabba li dożaġġ fuq bażi ta' ħamest ijiem fil-ġimgħa jista' jippermetti rkupru jew irtirar tat-tossiċità fil-perijodu li ma tkunx qed tiġI amministrata d-doża u b'hekk jiġi affettwat ir-riżultat u il-valutazzjoni sussegwenti. iżda, dożaġġ fuq bażi ta' ħamest ijiem fil-ġimgħa huwa kkunsidrat bħala aċċettabbli jekk wieħed jibbaża fuq konsiderazzjonijiet prattiċi.

Studji dermali

Esposizzjoni tal-ġilda tista' tiġi magħżula sabiex tiġi simulata rotta ewlenija t'esposizzjoni umana u bħala sistema mudell għal iżolazzjoni ta' ħsarat fil-ġilda.

Studji ta' ġbid fin-nifs

Peress li l-istudji tal-ġbid fin-nifs jippreżentaw problemi tekniċi ta' komplessità ikbar mir-rotot t'amministrazzjoni l-oħrajn, direzzjoni iktar dettaljata fuq dan il-mod t'amministrazzjoni hija mogħtija hawnhekk. Wieħed għandu wkoll jinnota li istillazzjoni intratrakeali tista' tikkostitwixxi alternattiva valida f'sitwazzjonijiet speċifiċi.

Esposizzjonijiet għal tul ta' żmien huma s-soltu mmudellati fuq esposizzjonijiet umani pproġettati, u l-annimali jingħataw jew esposizzjoni ta' kuljum ta' sitt sieġħat wara l-ekwilibrazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-kompartimenti, għal ħamest ijiem fil-ġimgħa (esposizzjoni intermittenti), jew, relevanti għal esposizzjoni possibbli ta' l-ambjent, 22 sa 24 sieġħat t'esposizzjoni għal kull jum għal sebat ijiem fil-ġimgħa (esposizzjoni kontinwa), b'bejn wieħed u ieħor sieġħa biex jingħata l-għalf lill-annimali kuljum f'ħin simili u manteniment tal-kompartiment. Fiż-żewġ każijiet, l-annimali huma s-soltu esposti għal konċentrazzjonijiet fissi tas-sustanza tat-test. Differenza prinċipali bejn l-espisizzjoni intermittenti u l-esposizzjoni kontinwa hija dik li f'ta' l-ewwel hemm perijodu ta' 17 sa 18 –il sieġħa li fih l-annimali jistgħu jirkupraw mill-effetti ta' l-esposizzjoni ta' kuljum, b'perijodi iktar twal ta' rkupru matul tmiem il-ġimgħa.

L-għażla ta' esposizzjoni intermittenti jew kontinwa tiddependi fuq l-objettivi ta' l-istudju u fuq l-esposizzjoni umana li tiġI simulate. iżda, ċerti diffikultajiet teknikI għandhom jiġu kkunsidrati. Per eżempju, il-vantaġġi t'esposizzjoni kontinwa għas-simulazzjoni ta' kondizzjonijiet ambjentali tista' tiġi bbilanċjata bin-neċessità għall-ilma u l-għalf waqt l-esposizzjoni, u bil-bżonn għal iktar ġenerazzjoni kkumplikata (iżda li tkun iktar ta' min jafdaha) t'ajrusol u ta' fwar u ta' tekniċi ta' sorveljar.

Kompartimenti ta' l-esposizzjoni

L-annimali għandhom jiġu ttestjati f'kompartimenti għall-ġbid fin-nifs disinnati sabiex iżommu fluss dinamiku ta' mill inqas 12 –il bidla fl-arja għal kull sieġħa biex b'hekk jiġi żgurat kontenut adegwat t'ossiġenu u atmosfera t'esposizzjoni lit kun distribwita fl-istess ammont. Il-kompartimenti tal-kontroll u ta' l-esposizzjoni għandhom ikunu identiċI fil-kostruzzjoni u disinnati biex jiżguraw kondizzjonijiet t'esposizzjoni komparabbli f'kull rispett għajr fl-esposizzjoni għas-sustanza tat-test. Presssjoni ftit negattiva ġewwa l-kompartiment hija ġeneralment miżmuma biex tipprevjeni telf tas-sustanza tat-test fiż-żona tal-madwar. Il-kompartimenti għandhom inaqqsu l-iffulla ta' l-annimali tat-test. Bħala regola ġenerali, sabiex tiġi żgurata l-istabilità ta' l-atmosfera tal-kompartiment, il-volum totali ta' l-annimali tat-test m'għandhiex taqbeż il-5% tal-volum tal-kompartiment.

Għandhom jiġu magħmulin qjisien jew osservar:

(i) tal-fluss ta' l-arja: ir-rata tal-fluss ta' l-arja mill-kompartiment għandha tkun preferibbilment sorveljata kontinwament.

(ii) tal-konċentrazzjoni: Matul il-perijodu ta' l-esposizzjoni ta' kuljum il-konċentrazzjoni m'għandhiex tvarja b'iktar minn ± 15% tal-valur intermedju.

(iii) tat-temperatura u l-umdità: għall-mammali gerriema, it-temperatura għandha tinżamm fi 22 ± 2 °C, u l-umdità fil-kompartiment fi 30 sa 70%, għajr fejn l-ilma huwa użat fis-sustanza tat-test fl-atmosfera tal-kompartiment. Preferibbilment dawn it-tnejn għandhom jiġu ssorveljati kontinwament;

(iv) tal-qjisien tad-daqs tal-partikoli: id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli għandha tiġi ddeterminata fl-atmosferi tal-kompartimenti li tinvolvi ajrusol likwidu jew solidu. Il-partikoli ta' l-ajrusol għandhom ikunu ta' daqs respirabbli għad-daqs ta' l-annimali użati. Kampjuni ta' l-atmosferi tal-kompaartimenti għandhom jiġu meħuda fiż-żona tan-nifs ta' l-annimali. Il-kampjun ta' l-aarja għandu jkun rappreżentattiv tad-distribuzzjoni taal-paartikuli li għalihom l-annimali huma esposti u għandhom jagħmlu tajjeb, fuq bażi gravimetrika, għall-ajrusol anke fejn ħafna mill-ajrusol ma kienx respirabbli. Analiżi tad-daqs tal-partikoli għandha tiġI magħmula frekwentement matul l-iżvilupp tas-sistema ġenerarja biex tiżgura l-istabilità ta' l-ajrusol u minn hemm 'il quddiem, daqs kemm ikun neċessarju matul l-esposizzjonijiet biex tiġI determinate adegwatament il-konsistenza tad-distribuzzjoni tal-partikoli li għalihom l-annimali kienu ġew esposti.

Dewmien ta' l-istudju

Id-dewmien tat-test tal-karċinoġeniċità jiġbor fih il-porzjoni ewlenija tat-tul ta' ħajja normali ta' l-annimali tat-test. It-terminu tat-test għandu jkun fi 18 –il xahar għall-ġrieden u l-ħamsters u 24 xahar għall-firien; iżda, għal ċertu razez t'annimali b'għomor ikbar/jew rata ta' tumor taħt il-ġilda baxxa, it-terminu għandu jkun fl-24 xahar għall-ġrieden u l-ħamsters u fi 30 xahar għall-firien. Bħala alternattiva, it-terminu ta' dan l-isstudju estiżhuwa aċċettabbli meta n-numru ta' sopravissuti fl-iktar livell baxx tad-doża jew fil-grupp tal-kontroll jilħaq il-25%. Meta jintemm test li fih ikun hemm reazzjoni differenti apparenti minħabba s-sess, iż-żewġ sessi għandhom jiġu konsiderati separatament. Meta l-grupp tad-doża l-għolja biss imut qabel iż-żmien għal raġunijiet ovvji ta' tossiċità, dan m'għandux jagħti lok għat-terminazzjoni jekk manifestazzjonijiet tossiċI mhumiex jikkawżaw problemi fil-gruppi l-oħrajn. Sabiex ikun aċċettabbli studju negattiv, mhux iktar minn 10% ta' kwalunkwe grupp jistgħu jintilfu mill-esperiment minħabba awtoliżi, kannibaliżmu jew problemi ta' maniġment u s-sopravissuti ta' kull grupp ikun ta' mhux inqas minn 50% fi 18 –il xahar għall-ġrieden u l-ħamsters u f'24 xahar għall-firien.

Proċedura

Osservazzjonijiet

Osservazzjonijiet ta' kuljum għandhom jinkludu xi tibdil fil-ġilda jew fil-fur, fl-għajnejn, fil-membrani mukuži kif ukoll fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċI u nervuži ċentrali, fl-attività somatomotorja u fil-mudell ta' mġieba.

Osservazzjonijiet regolari ta' l-annimali human eċessarji biex jiżguraw li, sakemm ikun possibbli, l-annimali mhumiex mitlufin mill-istudju minħabba kawżi ta' kannibaliżmu, awtoliżi tat-tessuti jew minħabba li jitqiegħdu f'xi post ieħor. Annimali moribondi għandhom jitneħħew u għandha ssirilhom nekroskopija meta avżati.

Is-sinjali kliniċi u l-mortalità għandhom jiġu mniżżlin għal kull annimal. Attenzjoni speċjali għandha tingħata lill-iżvilupp tat-tumuri: il-ħin ta' l-ewwel attakk, il-lokazzjoni, id-dimensjonijiet, id-dehra u l-progressjoni ta' kull tumur palpabbli li jkun visibbli għandhom jiġu mniżżlin.

Qjisien għandhom jittieħdu tal-konsum ta' l-ikel (u tal-konsum ta' l-ilma meta s-sustanza tat-test hija amministrata fl-ilma tax-xorb) ta' kull ġimgħa matul l-ewwel 13 –il ġimgħa ta' l-istudju u wara f'intervalli ta' bejn wieħed u ieħor tliet xhur jekk l-istat ta' saħħa jew it-tibdil fil-piż ta' l-annimali ma jiddettawx mod ieħor.

Il-piż tal-ġisem għandu jiġi mniżżel individwalment għall-annimali kollha matul l-ewwel 13 –il ġimgħa tal-perijodu tat-test u mill-inqas darba kull erba' ġimgħat minn hemm 'il quddiem.

Eżaminazzjonijiet tal-klinika

Ematoloġija

Jekk l-osservazzjonijiet juru deterjorament fis-saħħa ta' l-annimali matul l-istudju, kwantità differenzali ta' demm hija magħmula fuq l-annimali li jiġu affettwati.

Fit-12 –il xahar, fit-18 –il xahar, u qabel ma jiġu ssagrifikati, kampjun tad-demm huwa ottenut mill-annimali u mqieghed fuq slajd. Kwantità differenzali ta' demm hija magħmula fuq l-annimali tal-gruppi ta' doża għolja u tal-gruppi tal-kontroll. Jekk din id-data, partikolarment dik ottenuta minn eżami patoloġiku tindika l-ħtieġa, kwantità differenzali ta' demm għandha tiġi magħmula fuq l-annimali tal-livell li jkun imiss ukoll.

Nekroskopija totali

Nekroskopija totali u sħiħa għandha tiġi magħmula fuq l-annimali kollha, inklużi fuq dawk li mietu matul l-esperiment jew dawk li ġew maqtula meta ġew misjuba f'kondizzjoni moribonda. Il-ħsarat kollha visibbli, it-tumuri jew il-ħsarat suspettati li jkunu tumuri għandhom jiġu ppreservati.

L-organi u t-tessuti li ġejjin għandhom jiġu ppreservati f'mezzi addattati għal xi eżami istopatoloġiku futur: il-moħħ (sezzjonijiet tal-medulla/parti ta' l-għerq tal-moħħ li tgħaqqad il-medulla oblongata mat-talamu, il-kortiċi taċ-ċervellett u l-kortiċi celebrali), it-tessut pitwitarju, it-tessut tat-tirojde/tal-paratirojde, it-tessut tat-timu, il-pulmuni u t-trakea, il-qalb, l-aorta, il-glandoli tar-rieq, il-fwied, il-milsa, il-kliewi, l-adrenali, l-esofagu, l-istonku, id-duwodenu, il-parti ta' bejn id-duwodenu u l-ilju, l-ilju, il-musrana l-għamja, il-musrana l-ħoxna, ir-rektum, il-frixa, il-gonadi, l-utru, l-organi ġenitali aċċessorji, il-glandola tal-ħalib tas-sess femminil, il-ġilda, il-muskolatura, in-nerv periferali, in-nerv li jgħaddi minn ġos-sinsla fuq tliet livelli - ċervikali, toraċiku tan-nofs u tal-ġenbejn, l-isternu bl-għadam tal-mudullun u l-għajnejn.

In-nefħa tal-pulmuni u tal-bużżieqa ta' l-awrina b'fissattiv huwa l-mezz ottimali li jippreserva dawn it-tessuti; in-nefħa tal-pulmuni fi studji tal-ġbid fin-nifs hija essenzali għal eżami istopatoloġiku xieraq. Fi studji speċjali bħal dawk tal-ġbid fin-nifs, l-apparat respiratorju kollu għandu jiġi studjat, inkluż l-imnieħer, il-farinġi u l-larinġi.

Istopatoloġija

(a) Istopatoloġija sħiħa għandha tiġI magħmula fuq l-organi u t-tessuti ta' kull animal li miet jew li ġie ssagrifikat matul it-test u fuq l-annimali kollha fil-gruppi tad-doża qawwija u fil-gruppi tal-kontroll.

(b) It-tumuri kollha li jkunu visibbli jew il-ħsara li tkun suspettata lit kun tumor għandhom jiġu eżaminati mikroskopikament fil-gruppi kollha.

(c) Jekk ikun hemm differenzi sinjifikanti fl-inċidenza tal-ħsara neoplastika fil-gruppi tad-doża qawwija u fil-gruppi tal-kontroll, istopatoloġija għandha tiġI magħmula fuq dak l-organu jew tessut partikolari fil-gruppi l-oħrajn.

(d) Jekk is-sopravivenza fil-gruppi tad-doża għoljin hija sostanzjalment inqas minn dik fil-gruppi tal-kontroll, il-grupp tad-doża li jkun fil-livell iktar baxx li jmiss għandu jiġI eżaminat bir-reqqa.

2. DATA

Id-data għandha tiġi miġbura fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali li kien hemm fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li juru tumuri skoperti waqt it-test, il-ħin ta' l-iskoperta u n-numru ta' l-annimali li nstabu li kellhom tumur wara li ġew sagrifikati. Ir-riżultati għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' l-istatistika xieraq. Kwalunkwe metodu ta' l-istatistika rikonoxxut jista' jintuża.

3. RAPPORTAR

3.1. Rapport tat-test

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

— in-nisel ta' l-ispeċi jew ir-razza, minn fejn ġejja l-ispeċi, il-kondizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta,

— il-kondizzjonijiet tat-test:

Deskrizzjoni ta' l-apparat ta' l-esposizzjoni:

inkluż id-disinn, tip, dimensjonijiet, minn fejn tidħol l-arja, is-sistema tal-ġenerazzjoni ta' partikoli separati u ajrusol, il-metodu tal-kondizzjonar ta' l-arja, it-trattament ta' l-egżost ta' l-arja u l-metodu ta' l-akkomodazzjoni ta' l-annimali f'kompartimenti tat-test meta dawn huma użati. It-tagħmir għat-tkejjil tat-temperatura, umdità u, fejn xieraq, ta' l-istabilità tal-konċentrazzjonijiet ta' l-ajrusol jew id-daqs tal-paartikuli, għandhom jiġu deskritti.

Data ta' l-esposizzjoni:

din għandha tkun imqiegħda f'lista u ppreżentata b'valuri intermedji u b'miżura ta' varjabilità (per eżempju d-devjazzjoni ta' l-is*tandard*) u għandha tinkludi:

(a) rati tal-fluss ta' l-arja mit-tagħmir tal-ġbid fin-nifs;

(b) temperatura u umdità ta' l-arja;

(c) konċentrazzjonijiet nominali (l-ammont totali tas-sustanza tat-test imqiegħda fit-tagħmir tal-ġbid tan-nifs diviż bil-volum ta' l-arja);

(d) in-natura ta' sustanza oħra, jekk użata;

(e) konċentrazzjonijiet attwali fiż-żona tan-nifs ittestjata;

(f) daqsijiet medjani tal-partikoli (fejn xierqa),

— il-livelli tad-doża (inkluża xi sustanza, jekk użata) u konċentrazzjonijiet,

— data ta' l-inċidenza tat-tumur, bis-sess, bid-doża, u bit-tip ta' tumur

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali ssopravivewx sat-tmiem,

— data tar-reazzjoni tossika bis-sess u d-doża,

— deskrizzjoni ta' l-effetti tossiċI u ta' effetti oħrajn,

— il-ħin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u ż-żmien sussegwenti,

— data ta' l-għalf u tal-piż tal-ġisem,

— skoperti oftalmoloġiċi,

— skoperti tan-nekroskopija,

— dekrizzjoni dettaljata ta' l-iskoperti istopatoloġiċi kollha,

— trattament ta' l-istatistika tar-riżultati fejn huwa possibbli,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

TEST MAGĦQUD TA' TOSSIĊITÁ KRONIKA/KARĊINOĠENITÁ

1. METODU

1.1 Introduzzjoni

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2 Definizzjonijiet

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.3 Sustanzi għar-referenza

Xejn

1.4 Prinċipju tal-metodu tat-test

L-għan ta' dan it-test magħqud ta' tossiċitá/carcinogenity hu li jiddetermina l-effetti kroniċi u karċinoġeniċi ta' sustanza fi speċi mammifera wara li tkun esposta għal tul ta' żmien

Għal dan il-għan, test karċinoġeniku hu integrat almenu ma' grupp satellitari trattat u ma' grupp satellitari ta' kontroll. Id-doża użata għall-grupp satellitari b'doża għolja tista tkun għola minn dik użata mill-grupp ta' doża għolja fit-test karċinoġeniku. L-annimali fit-test karċinoġeniku huma eżaminati għal tossiċitá ġenerali kif ukoll għar-rispons karċinoġeniku. L-annimali fil-grupp satellita trattat huma eżaminati għal tossiċitá ġenerali.

Is-sustanza ittestjata hi normalment amministrata sebat ijiem fil-ġimgħa, skond mod adattat, lil diversi gruppi ta' annimali esperimentali, doża waħda kull grupp, għal parti kbira mill-ħajja tagħhom. Waqt u wara li jkunu esposti għas-sustanza ittestjata, l-annimali esperimentali huma osservati kuljum sabiex jiġu innutati is-sinjali ta' tossiċitá u l-iżvilupp ta' tumuri.

1.5 Kriterji Kwalitattivi

Xejn.

1.6 Deskrizzjoni tal-metodu tat-test

L-annimali huma miżmuma taħt kondizzjonijiet sperimentali ta' akkomodazzjoni u ikel almenu għal ħamest ijiem qabel it-test. Qabel it-test, annimali żgħar b'saħħithom huma mqiegħedha kif ġie ġie fil-gruppi.

Annimali Sperimentali

L-ispeċi preferut huwa l-ġurdien. Speċijiet oħrajn (gerriem jew mhux) jistgħu jkunu użati skond ir-riżultati ta' testijiet oħra kondotti qabel. Razez ta' annimali normalment użati fil-laboratorju għandhom jiġu utilizzati u l-għoti tad-doża għandu jibda kemm jista jkun malajr wara l-ftim.

Wara li jkun beda t-test, il-varjazzjoni ta' piż f'l-annimali m'għandhiex tkun aktar minn ± 20% tal-valur medju. Meta jkun kondott test sub-kroniku orali bħala test preliminari sa test b'terminu twil, l-istess speċi u razza għandhom ikunu użati fiż-żewġ studji.

Numru u sess

Għall-gerriema, almenu 100 annimal (50 mara u 50 raġel) għandhom ikunu użati f'kull livell ta' dożi u f'kull grupp ta' kontroll parallel. In-nisa ma jridu jkunu qatt welldu tarbija u mhux tqal. Jekk huma previsti sagrifiċċji fil-frattemp, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali li huma skedati għas-sagrifiċċju qbel ma jkun tlesta t-test.

Il-grupp(i) satellitari trattat(i) għall-valutazzjoni patoloġika aparti tumuri, għandhom jinkludu 20 annimal minn kull sess, mentri il-grupp satellita ta' kontroll għndu jinkludi 10 annimali minn kull sess.

Livelli ta' doża u frekwenza ta' espożizzjoni

Għal skopijiet ta' testijiet karċinoġeniċi, almenu tliet livelli ta' doża għandhom ikunu użati barra mill-grupp ta' kontroll. L-għola livell ta' doża għandu jagħti sinjali ta' tossiċità minima, bħal nuqqas fiż-żieda ta' piż (inqas minn 10%), mingħajr ma tinbidel il-ħajja normali minħabba effetti oħra aparti tumuri.

L-inqas livell ta' doża m'għandhiex tinterfjeri mat-tkabbir, żvilupp u tul normali ta' l-annimal kif ukoll m'għandhiex tipproduċi abda indikazzjoni ta' tossiċità. In ġenerali, dan m'għandux ikun inqas minn 10% tad-doża l-għolja.

Id-doża(i) intermedjarji għandhom ikunu stabbiliti f'intervall medju bejn id-dożi l-għoljin u l-baxxi.

Is-selezzjoni ta' livelli ta' dożi għandhom jieħdu in konsiderazzjoni id-data minn testijiet u studji preċedenti ta' tossiċità.

Għal skopijiet ta' ittestjar għat-tossiċità kronika, gruppi ittrattati u grupp parallel ta' kontroll satellitari addizjonali huma inklużi fit-test. Id-doża qawwija għal trattament ta' annimali tal-grupp satellitari għandha tkun tali li tipproduċi sinjali evidenti ta' tossiċità.

Normalment il-frekwenza ta' l-espożizzjoni hi ta' kuljum. Jekk il-kimika hi amministrata fl-ilma għax-xorb jew imħallta mad-dieta, din għandha tkun disponibbli kontinwament.

Kontrolli

Għandu jintuża grupp parallel, li jkun identiku f'kull aspett għall-gruppi trattati, bl-eċċezzjoni għall-espożizzjoni għall-bqija tas-sustanza.

F'ċirkostanzi speċjali, bħal fil-każ ta' studji permezz ta' ġbid għal ġol-pulmuni li jinvolvu aerosols jew l-użu ta' emulsjonant b'attività bijoloġika mhux karatterizzata fi studji orali, għandu jintuża grupp addizjonali ta' kontroll li mhux espost għas-sutanza li magħha jitħalltu xi mediċini.

Modi ta' amministrazzjoni

It-tliet modi prinċipali ta' amministrazzjoni huma: orali, permezz tal-ġilda, u ġbid għal ġol-pulmuni. L-għazla ta' dan il-mod tiddependi fuq il-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tas-sustanza ittestjata u għar-rotta ta' espożizzjoni fil-bnedmin.

Testijiet orali

Meta s-sustanza ittestjata tkun assorbita mill-apparat gastro-intestinali u r-rotta inġestiva tkun waħda ta' espożizzjoni għall-bnedmin, il-metodu ta' amministrazzjoni orali hu preferut, sakemm ma jkunx hemm kontra-indikazzjonijiet. L-annimali jistgħu jirċievu is-sustanza ittesjat fid-dieta tagħhom jew dissolta fl-ilma għax-xorb jew permezz ta' kapsula. Idealment, dożi ta' kuljum fuq bażi ta' sebat ijiem fil-ġimgħa għandhom jiġu użati peress li dożi fuq bażi ta' ħamest ijiem fil-ġimgħa jistgħu jippermettu fejqan jew irtirar tossiku fil-perjodu meta ma jingħatawx dożi u b'hekk jiġi affettwat ir-riżultat jew il-valutazzjoni suċċessiva tiegħu. Madankollu, fuq il-bażi ta' konsiderazzjonijiet prattiċi, dożi fuq bażi ta' ħamest ijiem fil-ġimgħa huma konsidrati bħala aċċettabbli.

Testijiet tal-ġilda

L-espożizzjoni tal-ġilda permezz ta' tpinġija tista' tkun magħżula biex tistimola ir-rotta ewlenija ta' espożizzjoni umana u bħala mudell ta' sistema għal bidu ta' feriti fil-ġilda.

Testijiet permezz ta' ġbid għal ġol-pulmuni

Peress li dawn it-testijiet għandhom problemi tekniċi aktar kumplessi mir-rottot l-oħra ta' amministrazzjoni, qed tingħata hawnhekk gwida aktar dettaljata fuq dan il-mod ta' amministrazzjoni. Ta' min jinnota li t-tiswib tal-pajp tan-nifs jista jikkostitwixxi alternattiva valida f'sitwazzjonijiet speċifiċi.

Espożizzjonijiet għal żmien twil normalment huma mfassla fuq espożizzjoni umana prevista, fejn l-annimali jingħataw jew espożizzjoni ta sitt sigħat kuljum wara l-ekwilibrazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-kamra, għal ħamest ijiem fil-ġimgħa (espożizzjoni intermittenti), jew, relevanti għal espożizzjoni ambjentali possibbli, 22 sa 24 siegħa ta' espożizzjoni kuljum għal sebat ijiem fil-ġimgħa (espożizzjoni kontinwa). B'madwar siegħa għal tmigħ kuljum ta' l-annimali fl-istess ħin u għaż-żamma tal-kmamar. Fiż-żewġ każijiet, l-annimali huma normalment esposti għal konċentrazzjonijiet fissi tas-sustanza ittestjata. Differenza kbira bejn espożizzjoni intemittenti u kontinwa hi li b'ta' l-ewwel hemm ġerjodu ta 17 sa 18-il siegħa fejn l-annimali jistgħu jirkupraw mill-effetti ta' kull espożizzjoni ta' kuljum, b'perjodu ta' rikoverazzjoni iktar twil fi tmiem il-ġimgħa.

L-għażla bejn espożizzjoni intermittenti jew kontinwa tiddependi fuq l-oġġettivi tat-test u fuq l-espożizzjoni umana lit rid tiġi simulata. Madankollu, ċerti diffikultajiet tekniċi għandhom ikunu kunsidrati. Per eżempju, il-vantaġġi ta' espożizzjoni kontinwa għal simulazzjoni ta' kondizzjonijiet ambjentali jistgħu jkunu kumpensati bin-neċessità għal tisqija u tmigħ waqt l-espożizzjoni u bil-bżonn għal aerosol u ġenerazzjoni ta' fwar u tekniki ta' osservazzjoni iktar ikkomplikati (u ta' min jafdahom).

Kmamar ta' l-espożizzjoni

L-annimali għandhom ikunu ittestjati fi kmamar ta' ġbid għal ġol-pulmuni, iddisinjati biex isostnu fluss dinamiku ta' almenu 12-il bdil ta' arja kull siegħa biex ikun assigurat kontenut ta' u ossiġnu adekwat u atmosfera ta' l-espożizzjoni ibbilanċjata. il-kmamar tal-kontroll u ta' l-espożizzjoni għandhom ikunu identiċi f'dik li hija kostruzzjoni u disinn sabiex jiġu żgurati il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni imqabbla f'kull rispe't b'eċċezzjoni ta' l-espożizzjoni għas-sustanzi ittestjati. Ftit pressjoni negattiva fil-kamra hi ġeneralment miżmuma sabiex tipprevjeni milli jkun hemm ħruġ tas-sustanza ittestjata fl-erja tal-madwar. Il-kmamar għandhom jimminimizzaw l-iffullar ta' annimali ittestjati. Bħala regola ġeneralim biex tiġi żgurata l-istabilitá ta' l-atmosfera tal-kamra, il-volum totali ta' annimali ittestjati m'għandux jaqbeż il-5% tal-volum tal-kamra.

Il-Qisien jew kontrolli iridu jkunu magħmula minn:

(i) Fluss ta' l-arja: ir-rata tal-fluss ta' l-arja fil-kamra għandu jkun ikkontrollat kontinwament;

(ii) Konċentrazzjoni: waqt il-perjodu ta' espożizzjoni ta' kuljum, il-konċentrazzjoni m'għandhiex tvarja b'iktar minn ±15% tal-valur medju. Tul il-ħin kollu ta' dan l-istudju, il-konċentrazzjonijiet ta' kuljum għandhom jinżammu kostanti daqs kemm prattikabbli;

(iii) Temperatura u Umditá: għal annimali gerriema, it-temperatura għandha tinżamm 22 ± 2°C, u l-umdita' fi ħdan il-kamra 30 sa 70%, bl-eċċezzjoni meta l-ilma jkun użat biex jissospendi is-sustanza ittestjata fl-atmosfera tal-kamra. Preferibilment it-tnejn għandhim ikunu kontrollati kontinwament;

(iv) Qisien tad-daqs tal-partikola: id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikola għandha tkun determinate fl-atmosferi tal-kamrali jinvolvu likwidu jew aerosols solidi. Il-partikoli ta' l-aerosols għandhom ikunu ta' daqs respiratorju għall-annimaali użati fit-test. Kampjuni ta' l-atmosferi tal-kamra għandhom jittieħdu fiż-żona fejn jieħdu n-nifs l-annimali. Il-kampjun ta' l-arja għandu jirrappreżenta id-distribuzzjoni tal-partikoli għal liema huma esposti l-annimali, u għandu jirrappreżenta fuq bażi gravimetrika, għall-aerosol sospiż kollu anke jekk ħafna minnu ma jkunx respirabbli. Analiżi tal-qies tal-partikola għandhom isiru frekwentement waqt l-iżvilupp tas-sistema ġenerattiva biex tiġi żgurata l-istabilitá ta' l-aerosol u minn hemm 'il quddiem ta' spiss skond il-bżonn waqt l-espożizzjonijiet biex tiġi determinata adekwatatment, il-konsistenza tad-distribuzzjoni tal-partikola għal liema ġew esposti l-annimali.

Tul tat-Test

It-tul tal-parti karċinoġenika tat-test tinkludi il-parti l-kbira tal-ħajja normali ta' l-annimali tat-test. It-tmiem tat-test għandu jkun 18-il xahar għal ġrieden u ħamsters u 24 xahar għal firien; madankollu, għal certi razez ta' annimali b' għomor twil u/jew spontanjetá baxxa ta' rata ta' tumor, it-tmiem għandu jkun 24 xahar għal ġrieden u ħamstersu 30 xahar għal firien. Alternattivament, it-tmiem ta' tests estiż bħal dan hu aċċettabbli meta n-numru ta' sopraviventi fid-doża l-iktar baxxa jew grupp ta' kontroll tilħaq 25%. Meta se jintemm tets fejn hemm evidenza ta' differenza sesswali fir-rispons, kull sess għandu jkun ikkunsidrat separatament. Meta jmut qabel iż-żmien il-grupp ta' doża għolja biss, għal raġunijiet ovvji ta' tossiċitá, dan m'għandux jikkawża tmiem sakemm manifestazzjonijiet tossiċi ma jkunux qed jikkawżaw problemi fil-gruppi l-oħra. Biex riżultat negattiv tat-test ikun aċċettabbli, mhux iktar minn 10% ta' kull grupp jista' jintilef mill-esperiment kawża ta' awtolisi, kannibaliżmu, jew problemi ta' maniġment, u s-sopravivenza tal-gruppi kollha ma tkunx inqas minn 50% fi 18-il xahar għal ġrieden u ħamsters u fi 24c xahar għall-firien.

Il-gruppi satelliti ta' 20 annimal (skond is-sess) dożat, u 10 (skond is-sess) ta' kontroll assoċjat użati għal ittestjar ta' tossiċitá kronika għanhom jinżammu fit-test almenu għal 12-il xahar. Dawn l-annimali għandhom ikunu destinati għal sagrifiċċju għal eżami tal-patoloġija konnessa mas-sustanza sperimentali mhux kumplikata b'tibdiliet ġerontoloġiċi.

Proċedura

Osservazzjonijiet

Għandhom isiru osservazzjonijiet ta' kuljum u dawn għandhom jinkludu osservazzjonijiet tal-kambjament fil-ġilda u fil-pil, għajnejn u membrane mukuża kif ukoll kampjament respiratorju, ċirkolatorju, is-sistemi nervuži ċentrali awtonomiċi, attivitá ta' ċaqliq tal-ġisem u mod ta' mġieba.

Eżaminazzjoni klinika għanha ssir f'intervalli adekwati fuq annimali fil-grupp(i) satellite trattati.

Osservazzjonijiet regolari fuq l-annimali huma neċessarji sabiex jiżguraw, sa fejn hu possibbli, li ma jintilfux annimali mit-test kawża ta' kannibaliżmu, awtolisi jew tqegħid mhux f'postu tat-tessuti. Annimali moribondi għandhom jitneħħew u ssirilhom awtopsja.

Sinjali kliniċi, inkluż kambjamenti newroloġiċi u fl-għajnejn kif ukoll il-mortalitá għandhom jiġu reġistrati għall-annimali kollha. Attenzjoni speċjali għandha tingħata għall-żvilupp tat' tumor: il-ħin li jfeġġ, il-post fejn qiegħed, dimensjonijiet, apparenza u progress ta' kull tumur kbir u viżibbli jew tumur paplpabbli għandhom jiġu rreġistrat; il-ħin li jfeġġ u l-progress ta' kondizzjonijiet tossiċi għandhom ikunu reġistrati.

Il-qisien ta' konsum ta' ikel (u konsum ta' ilma meta s-sustanza ittestjata tkun amministrata fl-ilma għax-xorb) għandhom jittieħdu kull ġimgħa matul l-ewwel 13-il ġimgħa ta' l-istudju u imbagħad bejn wieħed u ieħor f'intervalli ta' tliet xhur sakemm l-istat ta' saħħa u piż tal-ġisem ma jiddettawx mod ieħor.

Il-piżijiet ta' l-iġsma għandhom ikunu reġistrati individwalment għall-annimali kollha matul l-ewwel 13-il ġimgħa tal-perjodu tat-test u ta' l-inqas darba kull erba' ġimgħat minn hemm 'il quddiem.

Eżaminazzjonijiet kliniċi

Ematoloġija

L-eżaminazzjoni ematoloġika (eż. Kontenut emoglobina, volum taċ-ċellola, it-total ta' ċelluli ħomor tad-demm, it-total ta' ċelluli bojod tad-demm, diski żgħar numeruži fid-demm, jew miżuri oħra li potenzalment iwasslu għal demm magħqud) għandu jsir wara tliet xhur, sitt xhur u bejn wieħed u ieħor f'intervalli ta' sitt xhur minn hemm 'il quddiem, u fit-tmiem, fuq kampjuni ta' demm miġbura minn 10 firien/skond is-sess ta' kull grupp. Jekk hu possibbli. Il-kampjuni għandhom ikunu mill-istess firien f'kull intervall.

Jekk l-osservazzjonijiet kliniċi jissuġġerixxu deterjorazzjoni fis-saħħa ta' l-annimali waqt l-istudj, għandu jiġi esegwit għadd differenzali ta' demm ta' la-annimali milquta.

L-għadd differenzali ta' demm issir fuq kampjuni ta' dawk l-annimali mill-grupp ta' doża qawwija u l-kontrolli. L-għadd differenzali ta' demm isiru fuq il-grupp(i) ta' doża inferjuri li jmiss, biss jekk ikun hemm diskrepanza kbira bejn l-għola grupp u l-kontrolli, jew jekk ikun indikat mis-sejbiet patoloġiċi.

Analiżi kimika ta' l-awrina

Kampjuni ta' l-urina minn 10 firien/skond is-sess tal-gruppi kollha, jekk possibbli mill-istess firien fl-istess intrvalli bħall-eżaminazzjoni ematoloġika, għandhom jinġabru għall-analiżi. Id-determinazzjonijiet li ġejjin għandhom jiġu determinati jew minn annimali individwali jew fuq kampjun/sess/grupp ta' gerriema.

— apparenza: volum u densitá għal annimali individwali,

— proteïni, glukosju, ketoni, demm moħbi (semi-kwantitattiv),

— microskopija tas-sediment (semi-kwantitattiv).

Kimika klinika

F'intervalli ta' bejn wieħed u ieħor sitt xhur, u fit-tmiem, kampjuni ta' demm huma meħuda għal qisien ta' kimika klinika mill-annimali mhux gerriema kollha u minn 10 firien/sess tal-gruppi kollha u jekk possibbli mill-istess firien f'kull interval. Ma' dan għandu jinġabar kampjun qabel it-test mill-annimali mhux gerriema. Il-plasma hi preparata minn dawn il-kampjuni u jsiru dawn id-determinazzjonijiet li ġejjin:

— konċentrazzjoni totali ta' proteïni,

— konċentrazzjoni ta' albumina,

— testijiet fuq il-funzjoni tal-fwied (bħal attivitá alkalina ta' kull enzim li jikkatalizza s-sintesi jew l-idrolisi ta' fosfat organiku, glutamic pyruvic transaminase ([1]) activity u glutamic oxaloacetic transaminase ([2])), gamma glutamyl transpeptidase, ornithine decarboxylase,

— metaboliżmu karboidratiku bħal glukows tad-demm sajjem,

— testijiet fuq il-funzjoni tal-kliewi bħal nitroġenu urea tad-demm.

([1]) Issa magħrufa bhal serum alanini aminotransferasi
([2]) Issa magħrufa bhal serum aspartate aminotransferasi

Awtopsja sħiħa

Għandha ssir awtopsja kompluta fuq l-annimali kollha, inkluż dawk li mietu waqt l-esepriment jew kienu sagrifikati billi nstabu li kienu f'kondizzjoni moribonda. Qabel is-sagrifiċċju, kampjuni ta' demm għandhom jittieħdu mill-annimali kollha għall-għadd ta' demm differenzat. Kull tumur kbir viżibbli u feriti suspettati li huma tumuri għandhom ikunu preservati. Għandu jisir attentat sabiex jiġu korrelati l-osservazzjonijiet kbar ma' dawk mikroskopiċi.

L-organi u t-tessuti kollha għandhom ikunu preservati għal eżaminazzjoni istopatoloġiku. Dan ġeneralment jikkonċerna l-organi u t-tessuti li ġejjin: il-moħħ [1] (mudullun/sħiħ, il-kortiċi taċ-ċervellett, il-kortiċi ċerebrali), il-glandola pitwitarja, it-tirojde (inkluża il-paratirojde), it-timu, il-pulmuni (inkluż it-trakea) il-qalb, l-aorta, il-glandoli tal-bżieq, il-fwied, il-milsa, il-kliewi l-adrenali, l-esofagu, l-istonku, id-duwodenu, il-parti tal-musrana ż-żgħira bejn id-dwodenu u l-ilju, l-ileu, il-musrana l-għamja, kolon, rektum, bużżieqa ta' l-awrina, limfa magħquda, il-frixa, il-gonadil-organi ġenitali aċċessorji, glandola tal-ħalib fin-nisa, ġilda, muskulatura, nervitura periferali, is-sinsla tad-dahar (ċervikali, toraċiku, fil-ġenbejn) sternu bil-mudullun u l-wirk (inkluż il-ġog) u l-għajnejn.

Għalkemm li l-inflazzjoni tal-pulmuni u l-borża ta' l-urina b'sustanza li twaħħal hi l-mod opzjonali sabiex jiġu preservati dawn it-tessuti, l-inflazzjoni u l-istudju permezz ta' ġbid għal ġol-pulmuni hu rekwiżita neċessarju għal eżaminazzjon histopatolġika kif suppost. Fi studji speċjali bħalma huma l-istudji permezz ta' ġbid għal ġol-pulmuni, it-toroq respiratorji kollha għandhom ikunu studjati, inkluż l-imnieħer, il-farinġi u l-larinġi.

Jekk jiġu kondotti eżaminazzjonijiet kliniċi oħrajn, l-informazzjoni miksuba minn dawn il-proċeduri għandha tkun magħrufa qabel l-eżaminazzjoni mikroskopika, għax din tista tagħti gwida sgnnifikanti lill-patologu.

Istopatoloġija

Għall-parti tat-test li tirrigwarda t-tossiċità kronika:

Għandu jsir eżaminazzjoni dettaljat għall-organi preservati kollha ta' l-annimali kollha fil-gruppi satelliti b'doża għolja u fil-gruppi ta' kontroll. Fejn tinstab patoloġija relatata mas-sustanza ittestjata fil-grupp grupp satellite b'doża għolja, l-organi bersaljati ta' l-annimali l-oħra kollha f'kull grupp satellita trattat ieħor għandhom ikunu suġġetti għal eżaminazzjoni istoloġiku sħiħ u dettaljat kif ukoll dawk tal-grupp trattat fil-parti karċinoġenika tat-test fit-tmiem tiegħu.

Għall-parti karċinoġenika tat-test:

(a) Għandha ssir istopatoloġija sħiħa fuq l-organi u t-tessuti ta' l-annimali kollha li mietu jew ġew sagrifikati matul it-test, u ta' l-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doża għolja;

(b) It-tumuri jew il-feriti kollha li hemm suspett li huma tumuri li jidhru fi kwalunkwé organu fil-gruppi kollha għandhom jiġu eżaminati mikroskopikament;

(c) Jekk hemm differenza signifikanti fl-inċidenza ta' feriti neoplastiċi fil- gruppi b'doża għolja u gruppi ta' kontroll, l-istopatoloġija għandha ssir fuq dak l-organu partikolari jew tessut, fil-gruppi l-oħra;

(d) Jekk is-sopravivenza fil-grupp b'doża għolja hi sostanzjalment inqas minn dik fil-grupp ta'kontroll, allura il-grupp sussegwenti b'doża inqas għolja għandu jkun eżaminat kompletament;

(e) Jekk hemm evidenza fil-grupp b'doża għolja ta' l-induzzjoni ta' tossiku jew effetti oħra li jistgħu jaffettwaw rispons neoplastiku, il-grupp sussegwenti b'doża inqas għolja għandu jkun eżaminat kompletament.

2. DATA

Id-data għandha tkun miġbura fil-qosor f'forma tabulari, fejn għandhom jiġu murija in-numru ta' annimali fil-bidu tat-test f'kull grupp, in-numru ta' annimali li qed juru tumuri jew effetti tossiċi osservati waqt it-test, il-ħin li fih ġew osservati u n-numru ta' annimali li rriżulta li għandhom tumuri wara s-sagrifiċċju. Ir-riżultati għandhom jiġu evalwati b'metodu statistiku adattat. Kwalunkwé metodu rikonoxxut ta' statistika jista' jiġi użat.

3. RAPPURTAĠĠ

3.1 Rapport tat-test

Jekk possibbli, ir-rapport tat-test għandu jkollu l-informazzjoni li ġejja:

— speċijiet, sors ta' razza, kondizzjonijiet ambjentali, dieta,

[1] Dawn l-organi minn 10 annimali skond is-sess minn kull grupp fil-każ ta' gerriema għandhom jintiżnu.

— kondizzjonijiet tat-test:

Deskrizzjoni ta' l-apparat ta' l-espożizzjoni:

Inkluż id-disinn, tip, qisien, sors ta' arja, sistema biex tiġġenera partikoli separate u aerosols, metodu ta' kondizzjonar ta' arja, trattament ta' egżost u l-metodu ta' akkomodazzjoni ta' annimali f'kamra tat-test meta din tkun użata. L-apparat użat biex titkejjel it-temperatura, umditá u fejn hu xieraq, l-istabilitá tal-konċentrazzjoni ta' l-aerosol jew daqs tal-partikola, għandhom ikunu deskritti.

Data ta' l-espożizzjoni:

Dawn għandhom ikunu tabulate u preżentati bil-valuri medji u miżura ta' varjabilitá (eż. kwantitá kalkulata biex turi l-ammont ta' devjazzjoni ta' grupp meħud kollu kemm hu), u għandha tinkludi:

(a) rati ta' fluss ta' arja mill-apparat ta' ġbid għal ġol-pulmuni;

(b) temperatura u umditá ta' l-arja;

(c) konċentrazzjonijiet nominali (ammont totali tas-sustanza ittestjata li ntefgħet fl-apparat ta' ġbid għal ġol-pulmuni diviż bil-volum ta' l-arja);

(d) sustanza għat-taħlit, jekk użata;

(e) konċentrazzjonijiet attwali fiz-zona respiratorja tat-test;

(f) qisien medjani tal-partikoli (fejn japplikaw),

— livelli ta' doża (inkluż is-sustanza li titħallat magħha, jekk użata) u l-konċentrazzjonijiet,

— data ta' inċidenza ta' tumor skond is-sess, id-doża u t-tip ta' tumour,

— ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali li għexu sat-tmiem, inkluż il-grupp satellite,

— data ta' rispons tossiku skond is-sess u d-doża,

— deskrizzjoni ta' l-effetti tossiċi jew effetti oħrajn,

— il-ħin ta' osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u l-imġieba sussegwenti,

— sejbiet oftalmoloġiċi,

— ikel u piż tal-ġisem,

— testijiet ematoloġiċi użati u r-riżultati kollha,

— test ta' bijokimika klinika użat u r-riżultati kollha (inkluż kull analiżi kimika ta' l-awrina),

— sejbiet nekroskopiċi,

— deskrizzjoni dettaljat tas-sejbiet istopatoloġiċi,

— trattament statistiku tar-riżultati b'deskrizzjoni tal-metodi użati,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2 **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

4. **REFERENZI**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

TEST TA' TOSSIĊITÁ FUQ IR-RIPRODUZZJONI: ĠENERAZZJONI WAĦDA

1. **METODU**

1.1 **Introduzzjoni**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2 **Definizzjonijiet**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.3 **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4 **Prinċipju tal-metodu tat-Test**

Is-sustanza ittestjata hi amministrata f'dożi gradwati lil diversi gruppi ta' nisa u rġiel. L-irġiel għandhom ikunu iddożati waqt li jkunu qed jikbru u għallinqas għal ċiklu spermatoġenetiku wieħed (bejn wieħed u ieħor 56 ġurnata għall-ġurdien u 70 ġurnata għall-far) sabiex joħroġ kwalunkwé effetti negattiv tas-sustanza ittestjata fuq l-ispermatoġenesi.

Nisa tal-ġenerazzjoni parentali (P) għandhom ikunu iddożati għallinqas għal żewġ ċikli totali ta' saħna sesswali sabiex joħroġ kwalunkwé effett negattiv tas-sustanza ittestjata fuq din is-saħna sesswali. Imbagħad l-annimali jiġu mgħammra. Is-sustanza ittestjata tiġi amministrata liż-żewġ sessi waqt il-perjodu ta' tgħammir u minn hemm 'il quddiem lin-nisa waqt it-tqala u għall-perjodu ta' meta jkunu qed ireddgħu mill-ħalib ta' sidirhom.

Għall-amministrazzjoni permezz ta' ġbid minn gol-pulmuni, il-metodu jirrikjedi modifikazzjoni.

1.5 **Kriterji kwalitattivi**

Xejn.

1.6 **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Preparazzjonijiet

Qabel it-test, annimali zgħazagħ u b'saħħithom huma assenjati kif ġie ġie fil-gruppi trattati u fil-gruppi ta' kontroll. L-annimali huma miżmuma taħt kondizzjonijiet ta' akkomodazzjoni u ikel għallinqas għal ħamest ijiem qabel it-test.

Huwa rakkomandat li s-sustanza ittestjata tkun amministrata fid-dieta jew fl-ilma tax-xorb. Tipi oħra ta' amministrazzjoni huma aċċettabbli wkoll. L-annimali kollha għandhom ikunu iddożati bl-istess metodu waqt il-perjodu sperimentali xieraq. Jekk jintużaw xi sustanzi jew addittivi oħrajn li jiffaċilitaw l-għoti tad-doża, dawn għandhom ikunu magħrufa li ma jipproduċux effetti tossiċi.

L-għoti tad-doża għandu jkun fuq bażi ta' sebat ijiem fil-ġimgħa.

Annimali sperimentali

Selection of species

Il-far jew ġurdien huma l-ispeċi preferuta. Għandhom ikunu użati annimali b'saħħithom li ma kienux suġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. Razez b'fertilitá baxxa m'għandhomx ikunu użati. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċi, ir-razza, sess, piż u/jew etá.

Għal valutazzjoni adegwata tal-fertilitá, kemm l-irġiel kif ukoll in-nisa għandhom ikunu studjati. Kull annimal għat-test u għall-kontroll għandu jkun fatmat qabel tibda tingħata d-doża.

Numru u sess

Kull grupp trattat u ta' kontroll għandu jkollu numru biżżejjed ta' annimali sabiex ikun hemm 20 mara tqila kważi lesta biex tixtri jew qrib.

L-għan hu li hu li jkun hemm biżżejjed tqala u frieħ biex tkun assigurata valutazzjoni sinifikanti tal-potenzal li għandha s-sustanza biex taffettwa l-fertilitá, it-tqala u l-imġieba maternali fl-annimali tal-ġenerazzjoni P u fl-annimali mhux miftumin, fl-iżvilupp u t-tkabbir ta' frieħ ta' l-F_1 mill-konċepiment sal-ftim.

Kondizzjonijiet tat-test

Ilma u ikel għandhom ikunu provdut *ad libitum*. Meta jkunu viċin li jwelldu, in-nisa tqal għandhom ikunu magħluqa separatament f'gaġeġ għall-ħlas u jistgħu jiġu provduti b'materjal biex jibnu il-bejta tagħhom.

Livelli ta' doża

Għandhom jiġu użati għallinqas tliet gruppi trattati u wieħed ta' kontroll. Jekk tintuża sustanza oħra biex tkun amministrata s-sutsanza ittestjata, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi din is-sustanza fl-għola volum użata. Jekk sustanza ittestjata tikkawża tnaqqis fil-konsum tad-dieta, allura jista' jkun neċessarju l-użu ta' grupp ta' kontroll parallel. Idealment, sakemm mhux limitat bin-natura kimika/fiżika jew bl-effetti bijoloġiċi tas-sustanza ittestjata, l-għola doża għandha tikkaġuna tossiċità imma mhux mortalità fl-annimali parentali (P). Id-doża(i) intermedjarja(i) għandha tikkaġuna effetti tossiċi minimi li jistgħu jkunu attribwiti lis-sustanza ittestjata, u id-doża l-baxxa m'għandhiex tikkaġuna effetti negattivi osservabbli fuq il-ġenituri jew il-frieħ. Meta amministrata permezz ta' gavage jew kapsula, id-doża mogħtija lil kull animal għandha tkun ibbażata fuq il-piż tal-ġisem ta' l-annimal individwali u għandha tkun aġġustata kull ġimgħa minħabba tibdil fil-piż. Jekk mixtieq, fil-każ tan-nisa tqal, id-dożaġġi jistgħu jkunu ibbażati fuq il-piż tal-ġisem fil-ġurnata 0 jew 6 tat-tqala.

Test limitu

Fil-każ ta' sustanzi b'tossiċità baxxa, jekk il-livell ta' doża ta' għallinqas 1 000 mg/kilogramm ma jipproduċix evidenza ta' interferenza ma' l-imġieba riproduttiv, studji tad-doża f'livelli oħrajn jistgħu ma jiġux ikkunsidrati bżonnjużi. Jekk studju preliminari f'livell ta' doża qawwija, b'evidenza definite ta' tossiċità maternali, ma jurix effetti negattivi fuq il-fertilità, studji tad-doża f'livelli oħra jistgħu ma jiġux ikkunsidrati bżonnjużi.

Eżekuzzjoni tat-test

Skedi sperimentali

L-għoti tad-doża ta' kuljum lill-irġiel parentali (P) għandu jibda meta jkollhom età ta' madwar ħames sa disa ġimgħat, war li jkunu infatmu u akklimatizzati ta' l-iqas għal ħamest ijiem. Għall-firien, l-għoti tad-doża ikompli għal għaxar ġimgħat qabel il-perjodu ta' tgħammir (tmien ġimgħat għal ġrieden). L-irġiel għandhom jinqatlu u eżaminati jew fit-tmiem tal-perjodu ta' tgħammir jew inkella dawn jinżammu fuq id-dieta tat-test għall-produzzjoni possibbli tat-tieni wild u għandhom jinqatlu u eżaminati ftit qabel it-tmiem ta' l-istudju. Għal nisa parentali (P) l-għoti tad-doża għandu jibda għallinqas wara ħamest ijiem ta' akklimatizzazzjoni u jibqa' sejjer almenu għal ġimgħatejn qabel it-tgħammir. L-għoti ta' kuljum tad-doża lin-nisa P għandu jibqa' sejjer matul it-tliet ġimgħat ta' tgħammir, it-tqala sal-ftim tal-frieħ F_1. Il-modifikazzjoni ta' l-iskeda ta' l-għoti tad-doża fuq il-bażi ta' informazzjoni oħra fuq is-sustanza ittestjat, bħal induzzjoni tal-metaboliżmu jew bijo-akkumulazzjoni.

Proċedura ta' tgħammir

Fl-istudju ta' l-effetti tossiċi fuq ir-riproduzzjoni jistgħu jintużaw żewġ tipi ta' tgħammir, jew tgħammir 1:1 (raġel wieħed għal mara waħda) jew 1:2 (raġel wieħed għal żewġ nisa).

Ibbażat fuq tgħammir 1:1, mara waħda għandha titpoġġa ma' l-istess raġel sakemm ma sseħħ riproduzzjoni jew ikunu għaddew tliet ġimgħat. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tappijiet vaġinali. Il-ġurnata 0 tat-tqala hi definita bħala l-ġurnata meta jinstab tapp vaġinali jew tinstab l-isperma.

Dawk il-pari li ma jitgħammrux għandhom ikunu evalwati sabiex tiġi definita l-kawża tan-nuqqas ta' fertilità apparenti. Jista' jkun li din il-valutazzjoni tinvolvi proċeduri bħal li jiġu provduti opportunitajiet oħra sabiex jitgħammru ma' nisa jew irġiel oħra, eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi riproduttivi, u eżaminazzjoni taċ-ċiklu ta' saħna sesswali jew ta' spermatoġenesi.

Daqsijiet tal-gruppi ta' ulied/frieħ

Annimali li ingħatatilhom id-doża waqt l-istudju tal-fertilità huma permessi li jwelldu normalment u jrabbu l-frieħ tagħhom sa l-istadju tal-ftim mingħajr standardizzazzjoni tal-gruppi ta' ulied/frieħ.

Fejn issir standardizzazzjoni, il-proċedura sussegwenti hi rakkomandata. Bejn l-1 u r-4 ġurnata wara t-twelid, id-daqs ta' kull grupp ta' ulied/frieħ jista' jkun irranġat billi jkunu eliminati iż-żgħar żejda b'tali mod li jkun hemm sa fejn hu possibbli, erba' subien u erbgħat ibniet kull grupp ta' ulied/frieħ. Fejn in-numru ta' frieħ subien jew bniet jipprevenu mill jkun hemm erba' minn kull sess għal kull grupp ta' ulied, hu aċċettabbli arranġament parzjali (per eżempju, ħames subien u tlett ibniet). L-arranġamenti m'humiex applikabbli għall-gruppi ta' ulied/frieħ ta' inqas minn tmien frieħ.

Osservazzjonijiet

Matul dan il-perjodu tat-test, kull animal għandu jkun osservat għallinqas darba kuljum. Tibdil relevanti fl-imġieba, sinjali ta' diffikultá jew titwil tal-proċess tat-twelid u kull sinjal ta' tossiċitá, inkluż il-mortalitá għandhom ikunu irreġistrati. Waqt il-perjodi ta' qabel it-tgħammir u tat-tgħammir, il-konsum ta' l-ikel jista' jkun imkejjel kuljum. Wara t-twelid u waqt it-treddigħ, il-kejl tal-konsum ta' l-ikel (u ta' l-ilma meta s-sustanza ittestjata hi amministrata permezz ta' l-ilma tax-xorb) għandu jittieħed fl-istess ġurnata meta jintiżnu it-trabi l-ġodda. Irġiel u nisa P għandhom jintiżnu fl-ewwel ġurnata ta' l-għoti tad-doża u minn hemm 'il quddiem kull ġimgħa. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom jiġu rreġistrati individwalment għal kull animal adult.

It-tul tat-tqala għandu jkun ikkalkulat mill-ġurnata 0 tat-tqala. Kull grupp ta' ulied/frieħ għandu jkun eżaminat kemm jista' jkun malajr wara l-ħlas sabiex jiġi stabbilit in-numru u s-sess tal-frieħ, il-frieħ li twieldu mejta u dawk li twieldu ħajjin, u l-preżenza ta' anomaliji kbar.

Il-frieħ mejta u dawk sagrifikati għandhom ikunu preservati u studjati għal xi difetti possibbli. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jintiżnu il-gruppi ta' frieħ fl-għodwa ta' wara t-twelid, fir-4 u s-7 ġurnata kif ukoll kull ġimgħa minn hemm 'il quddiem sat-tmiem ta' l-istudju, meta l-annimali għandhom jintiżnu individwalment. Anormalitajiet fiżiċi kif ukoll fl-imġieba osservati fl-ommijiet jew fil-frieħ għandhom jiġu rreġistrati.

Patoloġija

Awtopsja

Fil-ħin tas-sagrifiċċju jew tal-mewt waqt l-istudju, l-annimali tal-ġenerazzjoni P għandhom jiġu eżaminati makroskopikament għal kwalunkwé anormalitajiet strutturali jew kambjamenti patoloġiċi, b'attenzjoni speċjali tingħata lill-organi tas-sitema riproduttiva. Frieħ mejta jew moribondi għandhom jiġu eżaminati għad-difetti.

Istopatoloġija

L-ovarji, l-utru, iċ-ċerviċi, il-vaġina, it-testikoli, il-kanali twal ta' wara l-bajd minn fejn tgħaddi l-isperma, il-bżieżaq seminali, il-prostata, il-glandola li tagħqqad, glandola pitwitarja u l-organu(i) immirati ta' l-annimali P kollha għandhom ikunu preservati għal eżaminazzjoni mikroskopika. Fl-eventwalitá li dawn l-organi ma kinux eżaminati fi studji oħrajn b'doża multipla, dawn, fejn hu possibbli, għandhom ikunu eżaminati mikroskopikament fl-annimali kollha fil-gruppi trattati b'doża għolja u fil-gruppi ta' kontroll u f'annimali li jmutu waqt l-istudju.

Organi, f'dawn l-annimali, li juru anormalitajiet, imbagħad, għandhom ikunu eżaminati fl-annimali P l-oħra kollha. F'dawn il-każijiet, għandha ssir eżaminazzjoni mikroskopika tat-tessuti kollha li juru kambjamenti patoloġiċi kbar. Kif suġġerit fil-proċeduri ta' tgħammir, l-organi riproduttivi ta' l-annimali suspettati b'infertilitá jistgħu jkunu suġeeti għal eżaminazzjoni mikroskopika.

2. DATA

Id-data tista' tkun miġbura fil-qosor f'forma tabulari, fejn għandhom jiġu murija in-numru ta' annimali fil-bidu tat-test f'kull grupp, in-numru ta' rġiel fertili, in-numru ta' nisa tqal, it-tipi ta' kambjamenti u l-persentaġġ ta' annimali li juru kull tip ta' kambjament.

When possible, numerical results should be evaluated by an appropriate statistical method. Any generally accepted statistical method may be used.

3. RAPPURTAĠĠ

3.1 Rapport tat-test

Jekk possibbli, ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni sussegwenti:

— speċi/razza użata,

— data tar-rispons tossiku skond is-sess u d-doża, inkluż il-fertilitá, it-tqala u l- vijabilitá,

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali għex sal-ħin tas-sagrifiċċju skedat jew sat-tmiem ta' l-istudju,

— tabella li turi il-piż ta' kull grupp ta' wlied, il-ferż medju u l-piżijiet individwali tal-frieħ fit-tmiem l-istudju,

— effetti tossiċi fuq ir-riproduzzjoni, fuq il-frieħ u l-iżvilupp wara t-twelid,

— il-ġurnata ta' meta ġie osservat kull sinjal anormali u l-imġieba sussegwenti tiegħu,

— id-data ta' piż tal-ġisem għall-annimali P,

— sejbiet nekroskopiċi,

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet mikroskopiċi kollha,

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn xieraq,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati,

3.2 **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

4. **REFERENZI**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

TEST TA' TOSSIĊITÁ FUQ IR-RIPRODUZZJONI: ŻEWĠ ĠENERAZZJONIJIET

1. **METODU**

1.1 **Introduzzjoni**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2 **Definizzjonijiet**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.3 **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4 **Prinċipju tal-metodu tat-test**

Is-sustanza ittestjata hi amministrata f'doži gradwati lil diversi gruppi ta' nisa u rġiel. L-irġiel tal-ġenerazzjoni parentali (P) għandhom ikunu iddożati waqt li jkunu qed jikbru u għallinqas għal ċiklu spermatoġenetiku wieħed (bejn wieħed u ieħor 56 ġurnata għall-ġurdien u 70 ġurnata għall-far) sabiex joħroġ kwalunkwé effetti negattiv tas-sustanza ittestjata fuq l-ispermatoġenesi.

Nisa tal-ġenerazzjoni parentali (P) għandhom ikunu iddożati għallinqas għal żewġ ċikli totali ta' saħna sesswali sabiex joħroġ kwalunkwé effett negattiv tas-sustanza ittestjata fuq din is-saħna sesswali. Imbagħad l-annimali jiġu mgħammra. Is-sustanza ittestjata tiġi amministrata liż-żewġ sessi waqt il-perjodu ta' tgħammir u minn hemm 'il quddiem lin-nisa biss waqt it-tqala u għall-perjodu ta' meta jkunu qed ireddgħu mill-halib ta' sidirhom. Waqt il-ftim l-amministrazzjoni tas-sustanza tkompli fuq il-frieħ F_1 waqt l-iżvilupp sa meta jsiru adulti, waqt it-tgħammir u l-produzzjoni ta' ġenerazzjoni F_2, sakemm il-ġenerazzjoni F_2, tkun miftuma. Għall-amministrazzjoni permezz ta' ġbid tan-nofs minn ġol-pulmuni, il-metodu jirrikjedi modifikazzjoni.

1.5 **Kriterji kwalitatittivi**

Xejn.

1.6 **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Preparazzjonijiet

Qabel it-test, annimali b'saħħithom huma assenjati kif ġie ġie fil-gruppi trattati u fil-gruppi ta' kontroll. L-annimali parentali (P) huma miżmuma taħt kondizzjonijiet ta' akkomodazzjoni u ikel għallinqas għal ħamest ijiem qabel it-test. Huwa rakkomandat li s-sustanza ittestjata tkun amministrata fid-dieta jew fl-ilma tax-xorb. Tipi oħra ta' amministrazzjoni huma aċċettabbli wkoll. L-annimali kollha għandhom ikunu iddożati bl-istess metodu waqt il-perjodu sperimentali xieraq. Jekk jintużaw xi sustanzi jew addittivi oħrajn li jiffaċilitaw l-għoti tad-doża, dawn għandhom ikunu magħrufa li ma jipproduċux effetti tossiċi.L-għoti tad-doża għandu jkun fuq bażi ta' sebat ijiem fil-ġimgħa.

Annimali sperimentali: selezzjoni ta' speċijiet

Il-far jew ġurdien huma l-ispeċijiet preferuti.

Għandhom ikunu użati annimali (P) b'saħħithom li ma kienux suġġetti għal proċeduri sperimentali preċedenti. Razez b'fertilitá baxxa m'għandhomx ikunu użati. L-annimali ittestjati għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċi, ir-razza, sess, piż u/jew etá.

Għal valutazzjoni adegwata tal-fertilitá, kemm l-irġiel kif ukoll in-nisa għandhom ikunu studjati. Kull annimal għat-test u għall-kontroll għandu jkun fatmat qabel tibda tingħata d-doża.

Numru u sess

Kull grupp trattat u ta' kontroll għandu jkollu numru biżżejjed ta' annimali sabiex ikun hemm 20 mara tqila kważi lesta biex tixtri jew qrib. L-għan hu li hu li jkun hemm biżżejjed tqala u frieħ biex tkun assigurata valutazzjoni sinifikanti tal-potenzal li għandha s-sustanza biex taffettwa l-fertilitá, it-tqala u l-imġieba maternali u l-annimali mhux miftumin, fl-iżvilupp u t-tkabbir ta' frieħ ta' l-F_1 mill-konċepiment sal-maturitá, u l-iżvilupp tal-frieħ tagħhom (F_2) sal-ftim.

Kondizzjonijiet tat-test

Ilma u ikel għandhom ikunu provdut *ad libitum*. Meta jkunu viċin li jwelldu, in-nisa tqal għandhom ikunu magħluqa separatament f'gaġeġ għall-ħlas u jistgħu jiġu provduti b'materjal biex jibnu il-bejta tagħhom.

Livelli ta' doża

Għandhom jiġu użati għallinqas tliet gruppi trattati u wieħed ta' kontroll. Jekk tintuża sustanza oħra biex tkun amministrata s-sutsanza ittestjata, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi din is-sustanza fl-għola volum użata. Jekk sustanza ittestjata tikkawża tnaqqis fil-konsum tad-dieta, allura jista' jkun neċessarju l-użu ta' grupp ta' kontroll parallel. Idealment, sakemm mhux limitat bin-natura kimika/fiżika jew bl-effetti bijoloġiċi tas-sustanza ittestjata, l-għola doża għandha tikkaġuna tossiċità imma mhux mortalità fl-annimali parentali (P). Id-doża(i) intermedjarja(i) għandha tikkaġuna effetti tossiċi minimi li jistgħu jkunu attribwiti lis-sustanza ittestjata, u id-doża l-baxxa m'għandhiex tikkaġuna effetti negattivi osservabbli fuq il-ġenituri jew il-frieħ. Meta amministrata permezz ta' gavage jew kapsula, id-doża mogħtija lil kull animal għandha tkun ibbażata fuq il-piż tal-ġisem ta' l-annimal individwali u għandha tkun aġġustata kull ġimgħa. Jekk mixtieq, fil-każ tan-nisa tqal, id-dożaġġ jista' jkunu ibbażat fuq il-piż tal-ġisem fil-ġurnata 0 jew 6 tat-tqala.

Test limitu

Fil-każ ta' sustanzi b'tossiċità baxxa, jekk il-livell ta' doża ta' għallinqas 1 000 mg/kilogramm ma jipproduċix evidenza ta' interferenza ma' l-imġieba riproduttiv, studji tad-doża f'livelli oħrajn jistgħu ma jiġux ikkunsidrati bżonnjużi. Jekk studju preliminari f'livell ta' doża qawwija, b'evidenza definite ta' tossiċità maternali, ma jurix effetti negattivi fuq il-fertilità, studji tad-doża f'livelli oħra jistgħu ma jiġux ikkunsidrati bżonnjużi.

Eżekuzzjoni tat-test

Skedi sperimentali

L-għoti tad-doża ta' kuljum lill-irġiel parentali (P) għandu jibda meta jkollhom età ta' madwar ħames sa disa ġimgħat, war li jkunu infatmu u akklimatizzati ta' l-iqas għal ħamest ijiem. Għall-firien, l-għoti tad-doża ikompli għal għaxar ġimgħat qabel il-perjodu ta' tgħammir (tmien ġimgħat għal ġrieden). L-irġiel għandhom jinqatlu u eżaminati jew fit-tmiem tal-perjodu ta' tgħammir jew inkella dawn jinżammu fuq id-dieta tat-test għall-produzzjoni possibbli tat-tieni wild u għandhom jinqatlu u eżaminati ftit qabel it-tmiem ta' l-istudju.

Għal nisa parentali (P) l-għoti tad-doża għandu jibda għallinqas wara ħamest ijiem ta' akklimatizzazzjoni u jibqa' sejjer almenu għal ġimgħatejn qabel it-tgħammir. L-għoti ta' kuljum tad-doża lin-nisa P għandu jibqa' sejjer matul it-tliet ġimgħat ta' tgħammir, it-tqala sal-ftim tal-frieħ F_1. Il-modifikazzjoni ta' l-iskeda ta' l-għoti tad-doża fuq il-bażi ta' informazzjoni oħra fuq is-sustanza ittestjat, bħal induzzjoni tal-metaboliżmu jew bijo-akkumulazzjoni.

L-għoti tad-doża lill-annimali F_1 jibda mal-ftim u jispiċċa meta dawn jiġu sagrifikati.

Proċedura ta' tgħammir

Fl-istudju ta' l-effetti tossiċi fuq ir-riproduzzjoni jistgħu jintużaw żewġ tipi ta' tgħammir, jew tgħammir 1:1 (raġel wieħed għal mara waħda) jew 1:2 (raġel wieħed għal żewġ nisa).

Ibbażat fuq tgħammir 1:1, mara waħda għandha titpoġġa ma' l-istess raġel sakemm ma sseħħ riproduzzjoni jew ikunu għaddew tliet ġimgħat. Kull filgħodu in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' tappijiet vaġinali. Il-ġurnata 0 tat-tqala hi definita bħala l-ġurnata meta jinstab tapp vaġinali jew tinstab l-isperma. Meta tittieħed in konsiderazzjoni l-ispermatoġenisi, il-frieħ F_1 m'għandhomx jitgħammru sakemm ma jkollhom ta' l-inqas 11-il ġimgħa fil-każ tal-ġrieden u 13-il ġimgħa fil-każ tal-firien. Biex jitgħammru il-frieħ F_1, jintgħażlu addoċċ, raġel wieħed u mara waħda minn kull grup ta' wlied/frieħ sabiex jiġu mgħammra ma' ferħ ta' grupp ieħor ta' wlied/frieħ mill-istess grupp ta' doża sabiex tiġi prodotta il-ġenerazzjoni F_2. Irġiel u nisa F_1 li ma jintgħażlux għat-tgħammir jinqatlu fil-ftim.

Dawk il-pari li ma jitgħammrux għandhom ikunu evalwati sabiex tiġi definita l-kawża tan-nuqqas ta' fertilitá apparenti. Jista' jkun li din il-valutazzjoni tinvolvi dawn il-proċeduri bħala opportunitajiet oħra sabiex jitgħammru ma' nisa jew irġiel oħra, eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi riproduttivi, u eżaminazzjoni taċ-ċiklu ta' saħna sesswali jew ta' spermatoġenesi.

Daqsijiet tal-gruppi ta' ulied/frieħ

Annimali li ingħatatilhom id-doża waqt l-istudju tal-fertilitá huma permessi li jwelldu normalment u jrabbu l-frieħ tagħhom sa l-istadju tal-ftim mingħajr standardizzazzjoni tal-gruppi ta' ulied/frieħ.

Fejn issir standardizzazzjoni, il-proċedura sussegwenti hi rakkomandata. Bejn l-1 u r-4 ġurnata wara t-twelid, id-daqs ta' kull grupp ta' ulied/frieħ jista' jkun irranġat billi jkunu eliminati iż-żgħar żejda b'tali mod li jkun hemm sa fejn hu possibbli, erba' subien u erbgħat ibniet kull grupp ta' ulied/frieħ. Fejn in-numru ta' frieħ subien jew bniet jipprevenu mill jkun hemm erba' minn kull sess għal kull grupp ta' ulied, hu aċċettabbli arranġament parzjali (per eżempju, ħames subien u tlett ibniet). L-arranġamenti m'humiex applikabbli għall-gruppi ta' ulied/frieħ ta' inqas minn tmien frieħ. L-arranġamenti tal-gruppi ta' ulied/frieħ F_2 isiru bl-istess mod.

Osservazzjonijiet

Matul dan il-perjodu tat-test, kull animal għandu jkun osservat għallinqas darba kuljum. Tibdil relevanti fl-imġieba, sinjali ta' diffikultá jew titwil tal-proċess tat-twelid u kull sinjal ta' tossiċità, inkluż il-mortalitá għandhom ikunu irreġistrati. Waqt il-perjodi ta' qabel it-tgħammir u tat-tgħammir, il-konsum ta' l-ikel jista' jkun imkejjel kull ġimgħa. Waqt it-tqala wieħed jista' jagħżel li jkejjel il-konsum ta' l-ikel kuljum. Wara t-twelid u waqt it-treddigħ, il-kejl tal-konsum ta' l-ikel għandu jittieħed fl-istess ġurnata meta jintiżnu it-trabi l-ġodda. Annimali parentali (P u F_1) għandhom jintiżnu fl-ewwel ġurnata ta' l-għoti tad-doża u minn hemm 'il quddiem kull ġimgħa. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom jiġu rreġistrati individwalment għal kull animal adult.

It-tul tat-tqala għandu jkun ikkalkulat mill-ġurnata 0 tat-tqala. Kull grupp ta' ulied/frieħ għandu jkun eżaminat kemm jista' jkun malajr wara l-ħlas sabiex jiġi stabbilit in-numru u s-sess tal-frieħ, il-frieħ li twieldu mejta u dawk li twieldu ħajjin, u l-preżenza ta' anomaliji kbar.

Il-frieħ mejta u dawk maqtula għandhom ikunu preservati u studjati għal xi difetti possibbli. Frieħ ħajjin għandhom jingħaddu u jintiżnu il-gruppi ta' frieħ fl-għodwa ta' wara t-twelid, fir-4 u s-7 ġurnata kif ukoll kull ġimgħa minn hemm 'il quddiem sat-tmiem ta' l-istudju, meta l-annimali għandhom jintiżnu individwalment. Anormalitajiet fiżiċi kif ukoll fl-imġieba osservati fl-ommijiet jew fil-frieħ għandhom jiġu rreġistrati.

Patoloġija

Awtopsja

L-annimali adulti P u F_1 kollha, għandhom jinqatlu meta dawn ma jkununx hemm iktar bżonnhom biex jiġu stmati l-effetti riproduttivi. Frieħ F_1 mhux magħżula għat-tgħammir u l-frieħ F_2 kollha għandhom jinqatlu wara li jkunu nfatmu.

Fil-ħin tas-sagrifiċċju jew tal-mewt waqt l-istudju, l-annimali parentali kollha (P u F_1) għandhom jiġu eżaminati makroskopikament għal kwalunkwé anormalitajiet strutturali jew kambjamenti patoloġiċi, b'attenzjoni speċjali tingħata lill-organi tas-sitema riproduttiva. Frieħ mejta jew moribondi għandhom jiġu eżaminati għad-difetti.

Istopatoloġija

L-ovarji, l-utru, iċ-ċerviċi, il-vaġina, it-testikoli, il-kanali twal ta' wara l-bajd minn fejn tgħaddi l-isperma, il-bżieżaq seminali, il-prostata, il-glandola li tagħqqad, glandola pitwitarja u l-organu(i) immirati ta' l-annimali P u F_1 kollha għandhom ikunu preservati għal eżaminazzjoni mikroskopika. Fl-eventwalitá li dawn l-organi ma kinux eżaminati fi studji oħrajn b'doża multipla, dawn, fejn hu possibbli, għandhom ikunu eżaminati mikroskopikament fl-annimali kollha fil-gruppi trattati b'doża għolja u fl-annimali P u F_1 ta' kontroll magħżula għat-tgħammir u, fejn ikun prattikabbli, f'annimali li jmutu waqt l-istudju. Organi, f'dawn l-annimali, li juru anormalitajiet, imbagħad, għandhom ikunu eżaminati fl-mill-gruppi l-oħra ta' doża kollha. F'dawn il-każijiet, għandha ssir eżaminazzjoni mikroskopika tat-tessuti kollha li juru kambjamenti patoloġiċi kbar. Kif suġġerit fil-proċeduri ta' tgħammir, l-organi riproduttivi ta' l-annimali suspettati b'infertilitá jistgħu jkunu suġeeti għal eżaminazzjoni mikroskopika.

2. **DATA**

Trattament tar-riżultati

Id-data tista' tkun miġbura fil-qosor f'forma tabulari, fejn għandhom jiġu murija in-numru ta' annimali fil-bidu tat-test f'kull grupp, in-numru ta' annimali tqal, it-tip ta' kambjamenti u l-persentaġġ ta' annimali li juru kull tip ta' kambjament.

When possible, numerical results should be evaluated by an appropriate statistical method. Any generally accepted statistical method may be used.

3. **RAPPURTAĠĠ**

3.1 **Rapport tat-test**

Jekk possibbli, ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni sussegwenti:

— speċi/razza użata,

— data tar-rispons tossiku skond is-sess u d-doża, inkluż il-fertilitá, it-tqala u l- indiċi ta' vijabilitá,

— il-ħin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali għex sal-ħin tas-sagrifiċċju skedat jew sat-tmiem ta' l-istudju,

— tabella li turi il-piż ta' kull grupp ta' wlied, il-ferż medju u l-piżijiet individwali tal-frieħ fit-tmiem l-istudju,

— effetti tossiċi fuq ir-riproduzzjoni, fuq il-frieħ u l-iżvilupp wara t-twelid,

— il-ġurnata ta' meta ġie osservat kull sinjal anormali u l-imġieba sussegwenti tiegħu,

— id-data ta' piż tal-ġisem għall-annimali P u F_1,

— sejbiet nekroskopiċi,

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet mikroskopiċi kollha,

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn xieraq,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati,

3.2 **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

4. **REFERENZI**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

TOSSIKOKINETIKA

1. METODU

1.1 Introduzzjoni

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2 Definizzjonijiet

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.3 Sustanzi għar-referenza

Xejn.

1.4 Prinċipju tal-metodu tat-test

Is-sustanza ittestjata hi amministrata permezz ta' rotta adattata. Is-sustanza tista tkun amministrata f'doży singoli jew ripetuti fuq perjodi definiti lil wieħed jew diversi gruppi ta' annimali sperimantali skond l-iskop ta' l-istudju. Sussegwentement, skond it-tip ta' studju, is-sustanza u/jew is-sustanzi meħtieġa għall-metaboliżmu huma determinati f'likwidi tal-ġisem, tessuti u/jew ekskreta.

L-istudji jistgħu jsiru b'sustanza ittestjata 'bit-tikketta' jew 'bla tikketta'. Meta tintuża tikketta din għandha tkun imqieghda fis-sustanza b'tali mod li tipprovdi kemm jista' jkun informazzjoni fuq id-destin tat-taħlita.

1.5 Kriterji kwalitattivi

Xejn.

1.6 Deskrizzjoni tal-metodu tat-test

Preparazzjonijiet

Annimali zgħar u b'saħħithom huma akklimatizzati għall-kondizzjonijiet tal-laboratorju għallinqas għal ħamestijiem qabel it-test. Qabel it-test, l-annimali huma assenjati bl-addoċċ fil-gruppi tat-trattament. F'sitwazzjonijiet speċjali, annimali zgħar ħafna tqal jew pre-trattati jistgħu jintużaw.

Kondizzjonijiet tat-test

Annimali sperimentali

Studji tossikokinetiċi jistgħu jsiru f'wieħed jew aktar speċi xierqa ta' annimali u għandhom jieħdu akkont ta' l-ispeċijiet użati jew li hem mil-ħsieb li jintużaw fi studji tossikoloġiċi oħra fuq l-istess sustanza ittestjata. Meta f'test jintużaw gerriema, il-varjazzjoni fil-piż m'għandhiex tkun iktar minn ±20% tal-piż medju.

Numru u sess

Għal studji ta' assorbiment u ta ekskreta, inizjalment għandu jkun hemm erba' annimali f'kull grupp ta' doża. Preferenza ta' sess m'hix mandatorja, imma taħt xi ċirkostanzi jista' jkun li jkollhom jiġu studjati iż-żewġ sessi. Jekk ikun hemm diferenzi ta' sess fir-rispons, allura erba' annimali ta' kull sess għandhom jiġu ittestjati. Fil-każ ta' studji b'annimali li mhux gerriema, jistgħu jintużaw inqas annimali.

Meta tkun studjata id-distribuzzjoni tat-tessuti, id-daqs tal-grupp inizjali għandu jieħu in konsiderazzjoni kemm in-numru ta' annimali li jridu jiġu sagrifikati f'kull fażi kif ukoll tal-fażijiet li ser ikunu eżaminati.

Meta qed ikun studjat il-metaboliżmu, id-daqs tal-grupp hu relatat mal-bżonnijiet ta' l-istudju.

Għall-studji b'doża multipla u b'fażijiet multipli, id-daqs tal-grupp għandu jieħu in konsiderazzjoni in-numru ta' fażijiet u s-sagrifiċċji pjanati, iżda ma jistgħux ikunu inqas minn żewġ annimali. Id-daqs tal-grupp għandu jkun biżżejjed li jipprovdi karatterizzazzjoni aċċettabbli ta' l-ammont, tal-plateau u tat-tnaqqis (kif xieraq) tas-sustanza ittestjata u/jew tas-sustanzi meħtieġa għall-metaboliżmu.

Livelli ta' doża

Fil-każ ta' amministrazzjoni ta' doża unika, ta' l-inqas żewġ livelli ta' doża għandhom jintużaw. Għandu jkun hemm doża baxxa f'liema ma jkunux osservati ebda effetti tossiċi u doża għolja f'liema jista' jkun hemm xi kambjamenti fil-parametri tossikokinetiċi jew fejn iseħħu effetti tossiċi.

Fil-każ ta' amministrazzjoni ta' doża ripetuta, id-doża l-baxxa hi normalment biżżejjed iżda f'ċerti ċirkostanzi jista' jkun hemm bżonn ta' doża għolja.

Rotta ta' amministrazzjoni

Studji tossikokinetiċi għandhom isiru billi tintuża l-istess rotta, u fejn hu xieraq, l-istess mezz bħal dak użat jew hemm l-intenzjoni li jkun użat fi studji tossiċi oħrajn. Is-sustanza ittestjata hi ġeneralmet amministrata mill-ħalq permezz ta' gavage jew fid-dieta, applikata lill-ġilda jew amministrata permezz ta' ġbid għal ġol-pulmuni għall-perjodi definiti lill-gruppi ta' annimali sperimentali. Amministrazzjoni minn ġol-vini tas-sutanza ittestjata tista' tkun ta' għajnuna sabiex jiġi determinat l-assorbiment relattiv permezz ta' rotot oħra. Informazzjoni utli tista tkun provduta fuq it-tfassil ta' distribuzzjoni kemm jista' jkun malajr wara l-amministrazzjoni ta' sustanza minn ġol-vini.

Il-possibiltá ta' interferenza tal-mezz mas-sustanza ittestjata għandu jittieħed in konsiderazzjoni. Għandha tingħata attenzjoni għad-differenzi fl-assorbiment bejn l-amministrazzjoni tas-sustanza ittestjat permezz ta' gavage u fid-dieta u l-bżonn li jkun hemm determinazzjoni eżatta tad-doża partikolarment meta is-sustanza ittestjata hi mogħtija fid-dieta.

Perjodu ta' osservazzjoni

l-annimali kollha għandhom ikunu osservati kuljum u għandhom jiġu irreġistrati is-sinjali ta' tossiċitá kif ukoll l-elementi kimiċi relevanti, inkluż il-ħin tal-bidu qalil, il-grad u t-tul ta' ħin.

Proċedura

Wara li jintiżnu l-annimali ittestjati, is-sustanza ittestjata hi amministrata permezz ta' rotta xierqa. Jekk relevanti, l-annimali għandhom jinżammu sajjmin qabel ma tkun amministrata is-sustanza ittestjat.

Assorbiment

Ir-rata u l-entitá ta assorbiment tas-sustanza amministrata jistgħu jkunu evelwati billi jintużaw diversi metodi, bil-gruppi ta' referenza jew mingħajrhom [1], per eżempju:

— billi jiġi determinat l-ammont tas-sustanza ittestjata u/jew is-sustanzi li jwasslu għall-metaboliżmu fl-ekskreta, bħall-urina, ħmieġ, bili, nifs mormi 'l barra u dak li jibqa fil-karkassa,

— billi jsir tqabbil tar-rispons bijoloġiku (eż. studji ta' tossiċitá akuta) bejn test u l- gruppi ta' kontroll u/jew gruppi ta' referenza,

— permezz tat-tqabbil ta' l-ammont ta' sustanza u/jew tas-sustanzi li jwasslu għall-metaboliżmu mneħħija mil-ġisem renalment u tqabbil mad-data minn grupp ta' referenza,

— billi tiġi determinate l-arja taħt il-livell ta' plażma/kurva ta' ħin tas-sustanza ittestjata u/jew sustanzi li jwasslu għall-metaboliżmu u tqabbil mad-data minn grupp ta' referenza.

[1] F'dan il-metodu grupp ta' referenza hu dak f'liema is-sutanza ittestjata hi amministrata permezz ta' rotta oħra li tassigura bijodidponibiltá kompleta tad-doża.

Ditribuzzjoni

Fil-preżent jeżistu żewġ proċeduri, wieħed jew it-tnejn li huma jistgħu jintużaw għall-analiżi tal-mudelli ta' distribuzzjoni:

— informazzjoni kwalitattiva utli hi akkwistata billi jintużaw tekniċi awtoradjografiċi tal-ġisem kollu,

— informazzjoni kwantitattiva hi akkwistata billi jiġu sagrifikati annimali f'ħinijiet differenti wara l-espożizzjoni u billi jiġu determinati il-konċentrazzjoni u l-ammont tas-sustanza ittestjata u/jew tas-sustanza li twassal għall-metaboliżmu fit-tessuti u l-organi.

Tkeċċija ta' ħmieġ il-ġisem

Fl-istudji ta' tkeċċija ta' ħmieġ il-ġisem, ħmieġ u arja maqtugħa u f'ċertu ċirkostanzi, bili, huma miġbura. L-ammont ta' sustanza ittestjata u/jew sustanzi li jwasslu għall-metaboliżmu f'dawn l-ekskreta għandhom jiġu mkejjla ħafna drabi wara l-espożizzjoni, jew sakemm tkun imkeċċija 95% tad-doża amministrata jew għal sebat ijiem, skond liema tiġi l-ewwel.

F'każijiet speċjali, it-tkeċċija tas-sustanza ittestjata fil-ħalib ta' annimali li jreddgħu, jista' jkun li tkun ikkonsidrata.

Metaboliżmu

Biex tiġi determinata l-entitá u l-mod ta' metaboliżmu, kampjuni bijoloġiċi għandhom ikunu analizzati b'tekniċi adattati. Strutturi ta' sustanzi li jwasslu għall-metaboliżmu għandhom ikunu elučidati u proposti toroq metaboliċi adattati fejn ikun hemm bżonn li jiġu risposti xi mistoqsijiet li joħorġu minn studji tossikoloġiċi preċedenti. Studji *in vitro* jistgħu jkunu ta' għajnuna biex tinkiseb informazzjoni fuq passaġġi metaboliċi.

Aktar informazzjoni fuq ir-relazzjoni tal-metaboliżmu mat-tossiċitá tista' tinkiseb minn studji bijokemikali bħad-determinazzjoni ta' l-effetti fuq sistemi ta' enzimi metabolizzanti, tbattil ta' kompożizzjonijiet sulfidriliċi endoġeni li mhux proteini u fuq l-unjoni tas-sostanza makromolekuli.

2. DATA

Id-data, jiddependi mit-tip ta' studju magħmul, għandha tkun miġbura fil-qosor f'forma tabulari bl-assistenza ta' preżentazzjoni grafika fejn hu xieraq. Għal kull grupp tat-test, varjazzjonijiet medji u statistiċi tal-qisien f'relazzjoni mal-ħin, dożaġġ, tessuti u organi għandhom jintwerew fejn xieraq. L-entitá ta' l-assorbiment u l-ammont u r-rata ta' tkeċċija ta' ħmieġ għandhom jiġu determinati b'metodi xierqa. Fejn isiru studji metaboliżmu, l-istruttura identifikata tas-sustanzi li jwassli għall-metaboliżmu, għandha tingħata kif ukoll jiġu preżentati il-passaġġi metaboliċi.

3. RAPPURTAĠĠ

3.1 Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja skond it- tip ta' studju magħmul:

— speċijiet, razza, sors, kondizzjonijiet ambjentali, dieta,

— karatterizzazzjoni ta' materjal bit-tikketta, meta użati,

— livelli ta' dożaġġ u intervalli użati,

— rotta/rotot ta' amministrazzjoni u kull mezz użat,

— effetti tossiċi u effetti oħrajn innotati,

— metodi ta' determinazzjoni tas-sustanza ittestjata u/jew sustanzi li jwasslu għall-metaboliżmu f'kampjunu bijoloġiċi, inkluż l-arja maqtugħa,

— tabella tal-qisien skond is-sess, doża, reġim, ħin, tessuti u organi,

— preżentazzjoni ta' l-entitá ta' assorbiment u tkeċċija ta' ħmieġ mill-ġisem biż-żmien,

— metodi għall-karatterizzazzjoni u identifikazzjoni tas-sustanzi li jwasslu għall- metaboliżmu f'kampjuni bijoloġiċi,

— metodi għall-qisien bijokemikali relatati mal-metaboliżmu,

— passaġġi proposti għall-metaboliżmu,

— diskussjoni tar-riżultati,

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2 **Valutazzjoni u interpretazzjoni**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

4. **REFERENZI**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

L-ITTESTJAR TAL-MUTAĠENI¬ITÀ U L-EŻAMIJIET GĦALL-KARĊINOĠENITÀ

IT-TIBDIL TAL-ĠENE - *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. **Il-metodu**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3 **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4 **Il-prinċipju tal-metodu għat-test**

Hemm varjetà ta' razez ta' l-aplojde u tad-diplojde tal-ħmira *Saccharomyces cerevisiae* li jistgħu jintużaw biex tkun ikkalkulata il-produzzjoni ta' tibdil tal-ġene li huwa kkaġunat minn aġenti kimiċi bl-attivazzjoni metabolika u mingħajr dik l-attivazzjoni.

Kienu użati sistemi ta' tibdil 'il-quddiem f'razez ta' l-aplojde, bħall-kalkolu tat-tibdil minn mutanti *(ade-1, ade-2)* ħomor li jeħtieġu l-adenina, għal mutanti bojod doppji li jeħtieġu l-adenina u sistemi selettivi bħall-ikkaġunar ta' reżistenza għall-*canavnaine* u għaċ-ċiklohessimida.

Is-sistema ta' tibdil b'lura li hija validata bil-mod l-iktar estensiv tinvolvi l-użu tar-razza ta' l-aplojde XV 185-14C li ġġorr il-bidliet *nonsense* ta' l-okra *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 u *trp* 5-48, li jistgħu jinqalbu lura b'mutaġeni li jissostitwixxu l-bażi u li jikkaġunaw tibdil speċifiku għas-sit jew tibdil li jrażżnu l-okra. XV 185-14C iġorr ukoll is-sinjal *his* 1-7, li huwa bidla *missense* li tista' tinqaleb lura prinċipalment b'tibdil tat-tieni sit, u s-sinjal *hom* 3-10 li jista' jinqaleb lura permezz ta' mutaġeni *frameshift*..

F'razez diplojdiċI ta' l-*S. cerevisiae* l-unika razza li tintuża b'mod estensiv hija D_7 li hija omozigota għal *ilv* 1-92.

1.5. **Kriterji għall-kwalità**

Xejn.

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Preparazzjonijiet

Is-soluzzjonijiet tal-kimiċi tat-test u l-kontroll għandhom ikunu ppreparati eżatt qabel l-ittestjar, bl-użu ta' vettura xierqa. Fil-każ ta' komposti organiċi li ma jinħallux fl-ilma, m'għandhiex tintuża iktar minn taħlita ta' 2% v/v ta' solventi organiċi bħall-etanol, l-aċetun jew id-dimetilsulfossidu (DMSO). Il-konċentrazzjoni finali tal-vettura m'għandhiex taffettwa b'mod sinifikanti il-vijabilità taċ-ċelluli u l-karatteristiċi tat-tkabbir.

L-attivazzjoni metabolika

Iċ-ċelluli għandhom ikunu esposti għall-kimiċi tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' l-attivazzjoni metabolika esoġena xierqa. Is-sistema li tintuża l-iktar spiss hija frazzjoni post-mitokondrijali supplimentata minn ko-fattur mill-fwied ta' mammali gerriema trattati minn qabel b'aġenti li jikkaġunaw l-enzimi.

L-użu ta' speċi, tessuti, frazzjonijiet post-mitokondrijali, jew proċeduri oħrajn jistgħu ukoll ikunu xierqa għall-attivazzjoni metabolika.

Kondizzjonijiet għat-test

Razez użati għat-test

Ir-razza aplojdika XV 185-14C u r-razza diplojdika D_7 huma dawk li jintużaw l-iktar fl-istudji dwar it-tibdil fil-ġeni. Razez oħrajn jistgħu ikunu xierqa ukoll.

Mezzi

Mezzi xierqa tal-kultura huma użati għad-determinazzjoni tan-numri tas-sopravivenza u tat-tibdil.

L-użu ta' kontrolli pożittivi u negattivi

Kontrolli tas-solventi, posittivi, li m'humiex trattati għandhom isiru fl-istess ħin. Kimiċi xierqa għall-kontroll posittiv għandhom jintużaw għal kull tarf speċifiku ta' tibdil.

Il-konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni

Għall-inqas ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mqassmin b'mod adegwat għandhom jintużaw. Għal sustanzi tossiċi, l-ogħla konċentrazzjoni ttestjata m'għandhiex tnaqqas is-sopravivenza għal inqas minn 5% sa 10%. Sustanzi li relattivament ma jinħallux fl-ilma għandhom ikunu ttestjati sal-limitu tas-solubilità tagħhom, bl-użu ta' proċeduri xierqa. Għal sustanzi li jinħallu b'mod faċli fl-ilma u li m'humiex tossiċi, l-ogħla konċentrazzjoni għandha tkun determinata skond il-każ.

Kondizzjonijiet għall-inkubazzjoni

Il-platti huma inkubati għal erba' sa sebat ijiem f'28 sa 30 °C fid-dlam.

Frekwenzi ta' tibil spontanju

Għandhom jintużaw sub-kulturi b'frekwenzi ta' tibdil spontanju ġewwa l-medda normali aċċettata.

Numru ta' repliki

Għandhom jintużaw għall-inqas tliet repliki tal-platti għal kull konċentrazzjoni għall-analiżi tal-*prototrophs* li jinħalqu bit-tibdil tal-ġeni u għall-vijabilità taċ-ċelluli. Fil-każ ta' esperimenti li jużaw sinjali bħal *hom* 3-10 b'rata baxxa ta' tibdil, in-numru ta' platti li jintużaw għandu jkun ikbar biex tinkiseb data rilevanti fis-sens statistiku.

Il-Proċedura

It-trattament tar-razez *S. cerevisiae* isir normalment bil-proċedura ta' test likwidu li jinvolvi ċelluli wieqfin jew li qed jikbru. Esperimenti inizjali għandhom isiru fuq ċelluli li qed jikbru: 1-5 x 10' ċelluli/ml huma esposti għall-kimika tat-test għal perjodu ta' ħin sa 18-il siegħa f'temperatura ta' 28-37°C biċ-ċaqliq; ammont adegwat tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika huwa miżjud waqt it-trattament meta xieraq. Fl-aħħar tat-trattament, iċ-ċelluli huma ċentrifugati, maħsulin u miżrugħin f'mezz ta' kultura xieraq. Wara l-inkubazzjoni, il-platti jiġu eżaminati għas-sopravivenza u għall-ikkaġunar tat-tibdil tal-ġeni.

Jekk l-ewwel esperiment ikun negattiv, għandu jsir esperiment ieħor bl-użu ta' ċelluli fil-fażi wieqfa. Jekk l-ewwel esperiment huwa pożittiv irid ikun ikkonfermat f'esperiment indipendenti xieraq.

2. **ID-DATA**

Id-data għandha tkun ippreżentata fil-forma ta' tabelli li jindikaw in-numru ta' kolonji mgħadda, in-numru ta' mutanti, is-sopravivenza u l-frekwenza tal-mutanti. Ir-riżultati kollha għandhom ikunu kkonfermati f'esperiment indipendenti. Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandhu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni il ġejja:

— ir-razza użata,

— il-kondizzjonijiet tat-test: ċelluli f'fażi wieqfa jew ċelluli li qed jikbru, komposizzjoniiet tal-mezzi, it-temperatura u t-tul ta' l-inkubazzjoni, is-sistema għall-attivazzjoni metabolika,

— il-kondizzjonijiet tat-trattament: il-livelli ta' l-espożizzjoni, il-proċedura u t-tul tat-trattament, it-temperatura tat-trattament, kontrolli pożittivi u negattivi,

— in-numru ta' kolonji mgħadda, in-numru ta' mutanti, is-sopravivenza u l-frekenza tal-mutanti, ir-relazzjoni doża/risposta fejn tapplika, il-valutazzjoni statistika ta-data,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzjoni Ġenerali Parti B.

IR-RIKOMBINAZZJONI MITOTIKA - *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi tar-referenza**

Xejn.

1.4. **Il-prinċipju tal-metodu tat-test**

Ir-rikombinazzjoni mitotika fis-*Saccharomyces cerevisiae* tistà tkun osservata bejn il-ġeni (jew b'mod iktar ġenerali bejn ġene u ċ-ċentromeru tagħha) u ġewwa l-ġeni. L-ewwel każ jissejjaħ il-qsim mitotiku u jiġġenera prodotti reċiproki filwat li t-tieni każ iktar spiss ma jkunx reċiproku u jissejjaħ il-konversjoni tal-ġeni. Il-qsim huwa ġeneralment analizzat permezz tal-produzzjoni ta' kolonji jew setturi omozigoti reċessivi prodotti f'razza eterozigota, filwaq li l-konversjoni tal-ġeni hija analizzata permezz tal-produzzjoni ta' *revertants* protorofiċi prodotti f'razza eteroallelika *auxotrophic* li tkun qed iġġorr żewġ alleli difettivi differenti ta' l-istess ġene. Ir-razez li jintużaw l-iktar spiss għall-iskoperta tal-konversjoni mitotika tal-ġeni huma D_4 (eteroalleliku f'*ade* 2 u *trp* 5) D_7 (eteroalleliku f'*trp* 5) BZ_{34} (eteroalleliku f'*arg* 4) u JD1 (eteroalleliku f'*his* 4 u *trp* 5). Il-qsim mitotiku li jipproduċi setturi omozigoti ħomor u roża jistgħu ikunu analizzati f'D_5 jew D_7 (li jikkalkula ukoll il-konversjoni mitotika tal-ġeni u t-tibdil b'lura f'*ilv* 1-92) fejn iż-żewġ razez huma eteroalleliċi għax jikkumplimentaw alleli ta' *ade* 2.

1.5. **Kriterji tal-kwalità**

Xejn

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Preparazzjonijiet

It-taħlitiet tal-kimiċi tat-test u l-komposti għal-kontroll u għar-referenza għandhom ikunu ppreparati eżatt qabel l-ittestjar, bl-użu ta' vettura xierqa. Fil-każ ta' komposti organiċi li ma jinħallux fl-ilma, m'għandhiex tintuża iktar minn taħlita ta' 2% v/v ta' solventi organiċi bħall-etanol, l-aċetun jew id-dimetilsulfossidu (DMSO). Il-konċentrazzjoni finali tal-vettura m'għandhiex taffettwa b'mod sinifikanti il-vijabilità taċ-ċelluli u l-karatteristiċi tat-tkabbir.

Attivazzjoni Metabolika

Iċ-ċelluli għandhom ikunu esposti għall-kimiċi tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' l-attivazzjoni metabolika esoġena xierqa. Is-sistema li tintuża l-iktar spiss hija frazzjoni post-mitokondrijali supplimentata minn ko-fattur mill-fwied ta' mammali gerriema trattati minn qabel b'aġenti li jikkaġunaw l-enzimi. L-użu ta' speċI, tessuti, frazzjonijiet post-mitokondrijali, jew proċeduri oħrajn jistgħu ukoll ikunu xierqa għall-attivazzjoni metabolika.

Kondizzjonijiet għat-test

Razez użati għat-test

Ir-razez użati l-iktar spiss huma d-diplojdi D_4, D_5, D_7 u JD1. L-użu ta' razez oħrajn jista' jkun xieraq.

Mezzi

Mezzi xierqa tal-kultura huma użati għad-determinazzjoni tas-sopravivenza u tal-frekwenza tar-rikombinazzjoni mitotika.

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Kontrolli tas-solventi, pożittivi, li m'humiex trattati għandhom isiru fl-istess ħin. Kimiċi xierqa għall-kontroll pożittiv għandhom jintużaw għal kull tarf speċifiku tar-rikombinazzjoni.

Il-konċentrazzjonijiet ta' l-espożizzjoni

Għall-inqas ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mqassmin b'mod adegwat għandhom jintużaw. Fost il-fatturi li għandu jittieħed qies tagħhom ħemm iċ-ċitotossiċità u s-solubilità. Il-konċentrazzjoni l-iktar baxxa m'għandha jkollha l-ebda effett fuq il-vijabilità taċ-ċelluli. Għal kimiċi tossiċi, l-ogħla konċentrazzjoni ttestjata m'għandhiex tnaqqas is-sopravivenza għal inqas minn 5% sa 10%. Kimiċi li relattivament ma jinħallux fl-ilma għandhom ikunu ttestjati sal-limitu tas-solubilità tagħhom, bl-użu ta' proċeduri xierqa. Għal sustanzi li jinħallu b'mod faċli fl-ilma u li m'humiex tossiċi, l-ogħla konċentrazzjoni għandha tkun determinata skond il-każ.

Iċ-ċelluli jistgħu ikunu esposti għall-kimiċi tat-test jew fil-fażi wieqfa tagħhom jew waqt li jkunu qed jikbru għal perjodi ta' ħin sa 18-il siegħa. Madankollu, għal ħinijiet twal ta' trattament il-kulturi għandhom ikunu spezzjonati b'mikroskopju għal formazzjonijiet ta' spori, li l-preżenza tagħhom twassal għall-invalidità tat-test.

Kondizzjonijiet għall-inkubazzjoni

Il-platti huma inkubati fid-dlam għal erba' sa sebat ijiem f'28 sa 30°C. Il-platti użati għal setturi omożigoti ħomor u roża li huma prodotti permezz tal-qsim mitotiku għandhom jinżammu f'refriġerejter (madwar 4 °C) għal ġurnata jew tnejn iktar qabel ma jiġu eżaminati jitħallew jiżviluppaw il-kolonji ippigmentati adegwati.

Frekwenzi ta' rikombinazzjoni mitotika spontanja

Għandhom jintużaw sub-kulturi b'frekwenzi ta' tibdil ta' rikombinazzjonijiet mitotiċi spontanji ġewwa l-medda normali aċċettata.

Numru ta' repliki

Għandhom jintużaw għall-inqas tliet repliki tal-platti għal kull konċentrazzjoni għall-analiżi tal-*prototrophs* li jinħalqu bil-konversjoni tal-ġeni mitotiċi u għall-vijabilità. Fil-każ ta' l-analiżi ta' l-omozigosi reċessiva prodotta bil-qsim mitotiku, in-numru ta' platti għandu jiżdied biex ikun provvdut numru adegwat ta' kolonji

Il-Proċeduri

It-trattament tar-razez *S. cerevisiae* isir normalment bil-proċedura ta' test likwidu li jinvolvi ċelluli wieqfin jew li qed jikbru. Esperimenti inizjali għandhom isiru fuq ċelluli li qed jikbru: 1-5 x 10^7 ċelluli/ml huma esposti għall-kimika tat-test għal perjodu ta' ħin sa 18-il siegħa f'temperatura ta' 28-37 °C biċ-ċaqliq; ammont adegwat tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika huwa miżjud waqt it-trattament meta xieraq.

Fl-aħħar tat-trattament, iċ-ċelluli huma ċentrifugati, maħsulin u miżrugħin f'mezz ta' kultura xieraq. Wara l-inkubazzjoni, il-platti jiġu eżaminati għas-sopravivenza u għall-ikkaġunar tar-rikombinazzjoni mitotika.

Jekk l-ewwel esperiment ikun negattiv, għandu jsir esperiment ieħor bl-użu ta' ċelluli fil-fażi wieqfa. Jekk l-ewwel esperiment huwa pożittiv irid ikun ikkonfermat f'esperiment indipendenti.

2. **ID-DATA**

Id-data għandha tkun ippreżentata fil-forma ta' tabelli li jindikaw in-numru ta' kolonji mgħadda, in-numru ta' rikombinanti, is-sopravivenza u l-frekwenza tar-rikombinanti.

Ir-riżultati għandhom ikunu kkonfermati f'esperiment indipendenti.

Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni li ġejja:

— ir-razza użata,

— il-kondizzjonijiet tat-test: ċelluli f'fażi wieqfa jew ċelluli li qed jikbru, komposizzjoni tal-mezzi, it-temperatura u t-tul ta' l-inkubazzjoni, is-sistema għall-attivazzjoni metabolika,

— il-kondizzjonijiet tat-trattament: il-konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni, il-proċedura u t-tul tat-trattament, it-temperatura tat-trattament, kontrolli pożittivi u negattivi,

— in-numru ta' kolonji mgħadda, in-numru ta' rikombinanti, is-sopravivenza u l-frekwenza tal-mutanti, ir-relazzjoni doża/risposta fejn tapplika, il-valutazzjoni statistika ta-data,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzjoni Ġenerali Parti B.

TEST TAT-TIBDIL TAL-ĠENI F'ĊELLULI MAMMIFERI *IN VITRO*

1. METODU

1.1. Introduzzjoni

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. Tifsira

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. Sustanzi ta' referenza

Xejn.

1.4. Il-prinċipju tal-metodu tat-test

Sistemi tal-kultura taċ-ċelluli mammiferi jistgħu jintużaw għall-iskoperta ta' tibdil ikkaġunat minn sustanzi kimiċi. Linji taċ-ċelluli li jintużaw ħafna jinkludu L5178Y ċelluli tal-limfoma tal-ġrieden u l-linji CHO u V-79 taċ-ċelluli ta' ħamsters ¬iniżi. F'dawn il-linji taċ-ċelluli is-sistemi li jintużaw l-iktar jikkalkulaw it-tibdil f'*thymidine kinase (TK), hypoxanthine guanine phosphorybosyl transferase (HPRT)* [1] u *NA/K ATPase loci*. Is-sistemi ta' tibdil TK u HPRT isibu t-tibdil ta' bażi ta' pari, tibdil *frameshift* u tħassir żgħir; is-sistema *NA/K* issib biss it-tibdil ta' bażi ta' pari.

Ċelluli nieqsin minn *thymidine kinase (TK),* minħabba t-tibdil 'l-quddiem *TK - T K,* huma reżistenti għall-bromodeossiuridina (BrdU), il-fluworodeossiuridina (FdU)jew it-trifluworotimidina (TFT) billi dawn l-antimetaboliti m'humiex inkorporati f'nukleotidi taċ-ċelluli permezz tas-sistema ta' l-enzimi tas-'salvataġġ' *thymidine kinase;* in-nukleotidi meħtieġa għall-metaboliżmu taċ-ċelluli jinkisbu biss minn sintesi *de novo*. Madankollu, fil-presenza ta' *thymidine kinase* BrdU, FdU jew TFT huma inkorporati fin-nukleotidi, bir-riżultat ta' l-inibizzjoni tal-metaboliżmu taċ-ċelluli u ċ-ċitotossiċità. B'hekk iċ-ċelluli mutanti jistgħu jipproliferaw fil-preżenza ta' BrdU, FdU jew TFT filwaqt li ċ-ċelluli normali, li fihom it-*thymidine kinase,* ma jistgħux. B'mod simili, iċ-ċelluli nieqsin mill-HPRT jintgħażlu skond ir-reżistenza għal 8-ażagwanina (AG) jew 6-tiogwanina (TG). ¬elluli b' *NA/K ATPase* alterati jintgħażlu skond ir-reżistenza għall-*ouabain*.

Iċ-ċitotossiċità hija determinata billi jitkejjel l-effett tal-materjal tat-test fuq il-kapaċitajiet għall-formazzjoni tal-kolonji (l-effiċjenza ta' l-ikklonjar) jew ir-rati tat-tkabbir tal-kulturi. Il-frekwenza tal-mutanti hija determinata billi jinżergħu numri magħrufa ta' ċelluli f'mezz li fih l-aġent selettiv għall-iskoperta ta' ċelluli mutanti, u f'mezz mingħajr l-aġent selettiv biex ikunu determinati ċ-ċelluli sopraviventi. Wara perjodu ta' l-inkubazzjoni xieraq, il-kolonji jingħaddu. Il-frekwenzi tal-mutanti huma mkejjla min-numru ta' kolonji ta' mutanti kkoreġuti għas-sopravivenza taċ-ċelluli.

1.5. Kriterji għall-kwalità

Xejn

1.6. Deskrizzjoni tal-metodu tat-test

Preparazzjonijiet

Ċelluli

Hemm varjetà ta' linji ta' ċelluli disponibbli għall-użu f'din l-analiżi. Dawn jinkludu subkloni ta' L5178Y, ċelluli CHO jew ċelluli V-79 b'sensitività murija għall-mutaġeni kimiċi, effiċjenza għolja ta' l-ikklonjar u frekwenza baxxa ta' tibdil spontanju. Iċ-ċelluli jistgħu ikunu kkontrollati b'mod perjodiku għall-istabilità tal-karjotip u għandhom ikunu kkontrollati għall-kontaminazzjoni tal-*Mycoplasma*. Jistgħu jintużaw tipi oħra ta' ċelluli jekk il-validità tagħhom bħala analiżi tat-tibdil tal-ġeni kkaġunat mill-kimiċi tista' tkun kompletament dokumentata.

[1] Li qabel kien HGPRT

Mezz

Mezzi ta' kultura u kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni xierqa (eż. temperatura, vettura għall-kultura, konċentrazzjonijiet ta' CO_2 u umdità) għandhom jintużaw. Mezzi u sera għandhom jintgħażlu skond is-sistemi selettivi u t-tipi ta' ċelluli użati fl-analiżi.

Sustanza tat-test

Sustanzi tat-test jistgħu ikunu ppreparati f'mezzi għall-kultura jew maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa qabel it-trattament taċ-ċelluli. Il-konċentrazzjoni finali tal-vettura fis-sistema tal-kultura m'għandhiex taffettwa il-vijabilità tar-rata tat-tkabbir.

L-attivazzjoni metabolika

Iċ-ċelluli għandhom ikunu esposti għas-sustanza tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' l-attivazzjoni tal-metaboliżmu mammiferu esoġenu xierqa. B'mod alternattiv, meta jintużaw tipi ta' ċelluli b'attività metabolika intrinsika ir-rata u n-natura ta' l-attività għandhom ikunu magħrufa li huma xierqa għall-klassi kimika li qed tkun ittestjata.

Kondizzjonijiet tat-test

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Kontrolli pożittivi, li jużaw kemm kompost attiv dirett kif ukoll kompost li jeħtieġ attivazzjoni metabolika, għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment; kontroll negattiv (tal-vettura) għandu jintuża ukoll.

Dawn li ġejjin huma eżempji ta' sustanzi li jistgħu jintużaw bħala kontrolli posittivi:

— komposti attivi diretti:

  — etilmetansulfonat,

  — *hycanthone*,

— komposti attivi indiretti:

  — 2-aċetilamminofluworin,

  — 7,12-dimetilbenżantraċene,

  — N-nitrosodimetilammina.

Meta xieraq, kontroll pożittiv addizzjonali ta' l-istess klassi kimika bħall-klassi kimika fit-test jista' jkun inkluż.

Konċentrazzjonijiet ta' l-espożizzjoni

Għandhom jintużaw bosta konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom joħolqu effett tossiku skond il-konċentrazzjoni, bl-ogħla konċentrazzjoni li toħloq livell baxx ta' sopravivenza u bis-sopravivenza fil-konċentrazzjoni l-iktar baxxa li tkun kważi l-istess daqs dik fil-kontroll negattiv.

Sustanzi li relattivament ma jinħallux fl-ilma għandhom ikunu ttestjati sal-limitu tas-solubilità bl-użu ta' proċeduri xierqa. Għal sustanzi li m'humhiex tossiċi u li jinħallu faċilment fl-ilma, l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test għandha tkun determinata skond il-każ.

Proċedura

In-numru ta' ċelluli użati għal kull kultura għandu jkun skond il-frekwenza ta' tibdil spontanju; gwida ġenerali hija l-użu ta' numru ta' ċelluli vijabbli li huwa għaxar darbiet l-invers tal-frekwenza tat-tibdil spontanju.

Iċ-ċelluli għandhom ikunu esposti għal perjodu ta' ħin xieraq, fil-biċċa l-kbira tal-każijiet bejn sagħtejn u ħames siegħat huwa effettiv. ¬elluli mingħajr attività metabolika intrinsika suffiċjenti għandhom ikunu esposti għas-sustanza tat-test fil-preżenza u fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika xierqa. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, iċ-ċelluli jinħaslu u jinħelsu mis-sustanza tat-test u jiġu kkultivati biex tkun determinata l-vijabilità u biex tkun tistà sseħħ l-espressjoni tal-fenotip tal-mutant.

Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espressjoni, li għandu jkun biżżejjed biex jippermetti espressjoni fenotipika kważi ottima, iċ-ċelluli jitkabbru fil-mezz b'aġenti selettivi kif ukoll mingħajr aġenti selettivi għad-determinazzjoni tan-numri ta' mutanti u l-vijabilità.

Ir-riżultati kollha jiġu ikkonfermati f'esperiment indipendenti.

2. **ID-DATA**

Id-data għandha tkun ippreżentata fil-forma ta' tabelli. Għandhom ikunu ppreżentati għadd u kontrolli individwali tal-platti għas-sustanza tat-test kemm għall-ikkaġunar tat-tibdil kif ukoll għas-sopravivenza. In-numru medju ta' kolonji għal kull platt u d-devjazzjoni standard għandhom jingħataw ukoll. Il-frekwenza tat-tibdil għandha tkun espressa bħala n-numru ta' mutanti skond in-numru ta' ċelluli sopraviventi. L-effiċjenzi tas-sopravivenza u ta' l-ikklonjar huma espressi bħala perċentwali tal-livell tal-kontroll.

Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi xierqa ta' l-istatistika.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni li ġejja:

— ir-razza użata, in-numru ta' kulturi ta' ċelluli, il-metodi biex jinżammu l-kulturi taċ-ċelluli,

— il-kondizzjonijiet tat-test: il-komposizzjoni tal-mezzi, il-konċentrazzjoni ta' CO_2, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, il-vettura użata, it-temperatura ta' l-inkubazzjoni, it-tul ta' l-inkubazzjoni, it-tul tal-perjodu għall-espressjoni (inkluż in-numru ta' ċelluli miżrugħin u subkulturi u skedi ta' l-ikel, jekk xierqa), it-tul tat-trattament, id-densità taċ-ċelluli waqt it-trattament is-sistema għall-attivazzjoni metabolika, il-kondizzjonijiet tat-trattament: il-konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni, il-proċedura u t-tul tat-trattament, it-tip ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika mammifera użata, kontrolli pożittivi u negattivi, l-aġent selettiv użat,

— ir-raġuni għall-għażla tad-doża,

— il-metodu użat biex ikunu enumerati n-numri ta' ċelluli vijabbli u mutanti,

— valutazzjoni statistika,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

DANNI U RIMEDJI TAD-DNA - SINTESI MHUX FL-ISKEDA TAD-DNA - ĊELLULI MAMMIFERI *IN VITRO*

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjonii Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4. **Il-prinċipju tal-metodu għat-test**

It-test tas-Sintesi tad-DNA li mhux fl-iskeda (UDS) ikejjel is-sintesi tar-rimedju tad-DNA wara l-qtugħ u t-tneħħija ta' ġibda ta' DNA li jkun fiha r-reġjun ta' dannu kkaġunat minn aġenti kimiċi u fiżiċi. It-test huwa bbażat fuq l-inkorporazzjoni ta' tritju mmarkat *thymidine* (^{3}H-TdR) fid-DNA ta' ċelluli mammiferi li m'humhiex fil-fażi S taċ-ċiklu taċ-ċellula. It-teħid ta' ^{3}H-TdR jista' jkun determinat bl-awtoradjografija jew bix-xintillar likwidu bl-għadd (LSC) tad-DNA miċ-ċelluli trattati. ¬elluli mammiferi fil-koltura, jekk ma jintużawx *hepatocytes* primarji tal-ġrieden huma trattati bl-aġent tat-test bis-sistema u migħajr is-sistema esoġena għall-attivazzjoni metabolika. UDS jista' jitkejjel ukoll f'sistemi *in vivo*.

1.5. **Kriterji tal-Kwalità**

Xejn

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu għat-test**

Preparazzjonijiet

Il-kimiċi tat-test u s-sustanzi għall-kontoll u għar-referenzi għandhom ikunu ppreparati f'mezz tat-tkabbir jew maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa u mbagħad dilwit f'mezz għat-tkabbir għall-użu fl-analiżi. Il-konċentrazzjoni finali tal-vettura m'għandhiex taffettwa l-vijabilità taċ-ċelluli.

Kulturi primarji ta' *hepatocytes* tal-ġrieden, limfoċite tal-bnedmin u razez taċ-ċelluli stabbiliti (eż. fibroblast tad-diplojde tal-bnedmin) jistgħu jintużaw fl-analiżi.

Iċ-ċelluli għandhom ikunu esposti għall-kimika tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika xierqa.

Kondizzjonijiet tat-test

Numru ta' kulturi

Għall-inqas żewġ kulturi ta' ċelluli għall-awtoradjografija u sitt kulturi (jew inqas jekk iġġustifikat b'mod xjentifiku) għad-determinazzjonijiet LSC UDS huma meħtieġa għal kull punt sperimentali.

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Għandhom ikunu inklużi fl-esperiment kontrolli pożittivi u negattivi (mhux trattati u/jew vettura) fl-istess ħin bl-attivazzjoni metabolika u mingħajr l-attivazzjoni metabolika.

Eżempji ta' kontrolli pożittivi għall-analiżi tal-*hepatocytes* tal-ġrieden jinkludu 7,12-dimetilbenżatraċene (7,12-DMBA) jew 2-aċetilamminofluworin (2-AAF). Fil-każ ta' razez ta' ċelluli stabbiliti 4-nitrokwinolina-N-ossidu (4-NQO) huwa eżempju ta' kontroll pożittiv kemm għall-analiżi awtoradjografika kif ukoll l-analiżi LSC mingħajr attivazzjoni metabolika; N-dimetilnitosammina huwa eżempju ta' kontroll pożittiv kompost meta jintużaw sistemi għall-attivazzjoi metabolika.

Konċentrazzjonijiet ta' l-espożizzjoni

Għandhom jintużaw numru ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fuq medda adegwata biex tkun definita r-risposta. L-ogħla konċentrazzjoni għandha jkollha xi effetti ċitotossiċi. Komposti li relattivament ma jinħallux fl-ilma għandhom ikunu ttestjati sal-limiti ta' l-insolubilità tagħhom. Għal kimiċi li jinħallu faċilment fl-ilma u li m'humhiex tossiċi, l-ogħla konċentrazzjoni tal-kimika tat-test għandha tkun determinata skond il-każ.

Ċelluli

Mezzi għat-tkabbir xierqa, il-konċentrazzjoni CO_2, it-temperatura u l-umdità għandhom ikunu użati fil-manteniment tal-kulturi. Razez taċ-ċelluli stabbiliti għandhom ikunu kkontrollati b'mod perjodiku għal kontaminazzjoni tal-*Mycoplasma*.

L-attivazzjoni Metabolika

Mal-kulturi primarji *hepatocyte* ma tintużax sistema għall-attivazzjoni metabolika. Razez taċ-ċelluli stabbiliti u l-limfoċiti huma esposti għas-sustanza tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema xierqa għall-attivazzjoni metabolika.

Proċedura

Preparazzjoni tal-kulturi

Razez taċ-ċelluli stabbiliti huma ġġenerati minn kulturi ta' l-istokk (eż. bit-tripsinizzazzjoni jew bit-tneħħija), miżrugħin f'vetturi għall-kultura f'densità xierqa, u inkubati f'37°C.

Kulturi għal żmien qasir ta' *hepatocytes* tal-ġrieden huma stabbiliti billi l-*hepatocytes* dissoċjati reċentement jitħallew f'mezz xieraq biex jeħlu mal-wiċċ li jkun qed jikber.

Kulturi tal-limfoċite tal-bnedmin jitwaqqfu bl-użu ta' tekniċi xierqa.

Trattament tal-kulturi bis-sustanza tat-test

Hepatocytes primarji tal-ġrieden

Hepatocytes tal-ġrieden iżolati reċentement huma trattati bis-sustanza tat-test f'mezz li fih ^{3}H-TdR għal tul ta' żmien xieraq. Fl-aħħar tal-perjodu tat-trattament, il-mezz għandu jitneħħa minn maċ-ċelluli, li mbagħad għandhom ikunu mlaħalħin, imwaħħlin u mnixxfin. L-islajds għandhom ikunu mgħaddsa f'emulsjoni awtoradjografika (jista' jintuża film alternattiv li jqaxxar), esposti, żviluppati, mlewwnin u mgħadda.

Razez taċ-ċelluli stabbiliti u limfoċiti

Tekniċi awtoradjografiċi: Il-kulturi taċ-ċelluli huma esposti għas-sustanza tat-test għal-tul ta' żmien xieraq u wara jkunu trattati b' ^{3}H-TdR. Il-ħiniiet għandhom ikunu gvernati min-natura tas-sustanza, l-attività ta' sistemi metaboliċi u t-tip ta' ċelluli. Biex tkun skoperta l-quċċata ta' UDS, ^{3}H-TdR għandu jkun miżjud jew fl-istess ħin mas-sustanza tat-test jew wara ftit minuti wara l-espożizzjoni għas-sustanza tat-test. L-għażla bejn dawn iż-żewġ proċeduri għandha tkun influwenzata mill-interazzjonijiet possibbli bejn is-sustanza tat-test u ^{3}H-TdR. Sabiex issir differenza bejn UDS u replika ta' DNA semi-konservattiva, din ta' l-aħħar tista' tkun inibita, per eżempju, bl-użu ta' mezz nieqes mill-arginina, kontenut baxx ta' serum jew bl-idrossiurea fil-mezz tal-kultura.

Kejl LSC tal-UDS: Qabel it-trattament bis-sustanza tat-test, id-dħul taċ-ċelluli fil fażi S għandu jkun imwaqqaf kif deskritt hawn fuq; iċ-ċelluli mbagħad għandhom ikunu esposti għall-kimika tat-test kif deskritt għall-awtoradjografija. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-inkubazzjoni, id-DNA għandu jinħareġ miċ-ċelluli u l-kontenut totali ta' DNA, u l-miżura ta' inkorporazzjoni ta' ^{3}H-TdR għandhom ikunu determinati.

Għandu jkun innotat li, fejn jintużaw il-limfoċiti tal-bnedmin fit-teknikI msemmija hawn fuq, it-trażżin tar-replika tad-DNA semi-konservattiva m'huwiex meħtieġ f'kulturi li m'humhiex stimolati.

Analiżi

Determinazzjonijiet awtoradjografiċi

Fid-determinazzjoni ta' UDS fiċ-ċelluli fil-kultura, in-nuklei fil-fażi S ma jingħaddux. Għall-inqas 50 ċellula għal kull konċentrazzjoni għandha tingħad. L-islajds għandhom jingħataw kodiċI qabel ma jingħaddu. Għandhom jingħaddu bosta oqsma kif jinzertaw separati sew fuq kull slajd. L-ammont ta' ^{3}H-TdR inkorporat fiċ-ċitoplasma għandu jkun determinat billi jingħaddu tlett partijiet b'daqs ta' nukleu fiċ-ċitoplasma ta' kull ċellula li tingħadd.

Determinazzjonijiet LSC

Għandu jintuża numru adegwat ta' kulturi f'kull konċentrazzjoni u fil-kontrolli fid-determinazzjonijiet LSC UDS.

Ir-riżultati kollha għandhom ikunu kkonfermati f'esperiment indipendenti.

2. **ID-DATA**

Id-data għandha tkun ippreżentata f'forma ta' tabelli.

2.1. **Determinazzjonijiet awtoradjografiċi**

L-ammont ta' ^{3}H-TdR inkorporat fiċ-ċitoplasma u n-numru ta' frak li jinstabu fuq in-nukleu taċ-ċellula għandhom ikunu miktubin separati.

Il-medja, il-medjan u l-*mode* jistgħu jintużaw biex jiddeskrivu d-distribuzzjoni tal-miżura ta' ^{3}H-TdR inkorporat fiċ-ċitoplasma u n-numru ta' frak għal kull nukleu.

2.2. **Determinazzjonijiet LSC**

Għal determinazzjonijiet LSC, l-inkorporazzjoni ta' ^{3}H-TdR għandha tkun irrapportata bħala dpm/µg DNA. Il-medja dpm/µg DNA b'devjazzjoni standard tista' tintuża biex tiddeskrivi d-distribuzzjoni ta' l-inkorporazzjoni.

Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni li ġejja:

— Iċ-ċelluli użati, id-densità u n-numru tal-passaġġ waqt it-trattament, in-numru ta' kulturi ta' ċelluli,

— il-metodi użati biex jinżammu l-kulturi taċ-ċelluli inklużi l-mezzi, it-temperatura u l-konċentrazzjoni ta' CO_2,

— is-sustanza tat-test, il-vettura, il-konċentrazzjonijiet u r-raġuni għas-selezzjoni tal-konċentrazzjonijiet użati fl-analiżi,

— id-dettalji tas-sistemi għall-attivazzjoni metabolika,

— l-iskeda għat-trattament,

— kontrolli pożittivi u negattivi,

— teknika awtoradjografika użata,

— proċeduri użati biex jitwaqqaf id-dħul ta' ċelluli fil-fażi S,

— proċeduri użati għall-ħruġ ta' DNA u d-determinazzjoni tal-kontenut totali ta' DNA fid-determinazzjoni LSC,

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

— il-valutazzjoni statistika,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

ANALIŻI *IN VITRO* TA' L-ISKAMBJU TA' KROMATID OĦT

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4. **Il-prinċipju tal-metodu għat-test**

L-analiżi ta' l-Iskambju ta' Kromatid Oħt (SCE) huwa test fuq żmien qasir għall-iskoperta ta' skambji reċiproki ta' NA bejn żewġ kromatidi aħwa ta' kromosoma li tirdoppja. L-SCE's jirrappreżentaw l-interkambju ta' prodotti tar-replika tad-DNA f'postijiet li jidhru li huma omologi. Il-proċess ta' l-iskambju preżumibbilment jinvolvi l-ksur u tgħaqqid mill-ġdid tad-DNA, għalkemm ftit huwa magħruf dwar il-bażi molekulari tiegħu. L-iskoperta ta' SCE's teħtieġ xi mod ta' tikkettjar differenti tal-kromatidi aħwa u dan jista' jinkiseb bl-inkorporazzjoni ta' bromodeossiuridina (BrdU) fid-DNA kromosomali għal żewġ ċikli taċ-ċelluli.

Ċelluli mammiferi *in vitro* huma esposti għall-kimika tat-test b's-sitema għall-attivazzjoni metabolika esoġena mammifera kif ukoll mingħajrha, jekk xieraq, u kkulturati għal żewġ dawriet ta' repliki f'mezz li fih il-BrdU. Wara t-trattament b'inibitur tal-magħżel (eż. il-kolkiċina) biex ikunu akkumulati ċ-ċelluli fi stat ta' mitosi simili għall-metafasi (c-metafasi), iċ-ċelluli huma maħsuda u jsiru l-preparazzjonijiet tal-kromosomi.

1.5. **Kriterji għall-kwalità**

Xejn.

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Preparazzjonijiet

— Fl-analiżi jistgħu jintużaw kulturi primarji, (limfoċiti tal-bnedmin) jew razez taċ ċelluli stabbiliti (eż. ċelluli ovarji tal-ħamsters ¬iniżi). Ir-razez taċ-ċelluli għandhom ikunu kkontrollati għall-kontaminazzjoni tal-*Mycoplasma*.

— Għandhom jintużaw mezzi tal-kultura u kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni xierqa (eż. temperatura, reċipjenti għall-kultura, CO_2, konċentrazzjoni u umdità),

— Sustanzi tat-test jistgħu ikunu ppreparati fil-mezzi għall-kultura jew maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa qabel it-trattament taċ-ċelluli. Il-konċentrazzjoni finali ta' vettura fis-sistema tal-kultura m'għandhiex taffettwa b'mod sinifikattiv il-vijabilità jew ir-rata ta' tkabbir taċ-ċelluli u l-effetti fuq il-frekwenza SCE għandhom ikunu kontrollati b'solvent ta' kontroll,

— Iċ-ċelluli għandhom ikunu esposti għas-sustanza tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika mammifera esoġena. B'mod alternattiv, meta jintużaw ċelluli b'attività metabolika intrinsika, ir-rata u n-natura ta' l-attività għandhom ikunu xierqa għall-klassi tal-kimika li tkun qed tiġi ttestjata.

Kondizzjonijiet għat-test

Numru ta' kulturi

Għandhom jintużaw għall-inqas kulturi doppji għal kull punt sperimentali.

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Kontrolli pożittivi, li jużaw kemm kompost attiv dirett kif ukoll kompost li jeħtieġ attivazzjoni metabolika, għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment; kontroll tal-vettura għandu jintuża ukoll.

Dawn li ġejjin huma eżempji ta' sustanzi li jistgħu jintużaw bħala kontrolli posittivi:

— komposti attivi diretti:

  — etilmetansulfonat,

— komposti attivi indiretti:

  — ċiklofosfamida

Meta xieraq, kontroll pożittiv addizzjonali ta' l-istess klassi kimika bħall-kimika fit-test jista' jkun inkluż.

Konċentrazzjonijiet ta' l-espożizzjoni

Għandhom jintużaw għall-inqas tlett konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mqassma b'mod adegwat. L-ogħla konċentrazzjoni għandha toħloq effett tossiku sinifikanti iżda xorta għandha tippermetti r-replika adegwata taċ-ċelluli. Sustanzi li relattivament ma jinħallux fl-ilma għandhom ikunu ttestjati sal-limitu tas-solubilità bl-użu ta' proċeduri xierqa. Għal sustanzi li m'humhiex tossiċi u li jinħallu faċilment fl-ilma, l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test għandha tkun determinata skond il-każ.

Proċedura

Preparazzjoni tal-kulturi

Ir-razez taċ-ċelluli stabbiliti huma ġenerati minn kulturi ta' l-istokk (eż. bit-tripsinizzazzjoni jew bit-tneħħija), miżrugħin f'reċipjenti tal-kultura f'densità xierqa u inkubati f'37°C. Għal kulturi b'saff wieħed, in-numru ta' ċelluli għal kull reċipjent tal-kultura għandu jkun aġġustat sabiex il-kulturi ma jkunux ħafna iktar minn 50% konfluwenti fiż-żmien tal-ħsad. Alternattivament, iċ-ċelluli jistgħu jintużaw f'kultra ta' sospensjoni. Il-kulturi tal-limfoċita tal-bnedmin huma mwaqqfa minn demm eparinizzat, bl-użu ta' tekniċi xierqa, u inkubati f'37°C.

It-trattament

Iċ-ċelluli li qegħdin fl-istadju ta' tkabbir esponenzali huma esposti għas-sustanza tat-test għal perjodi ta' ħin adegwat; fil-biċċa l-kbira tal-każijiet siegħa jew sagħtejn jistgħu ikunu effettivi, iżda l-ħin tat-trattament jista' jkun estiż sa żewġ ċikli taċ-ċelluli f'ċerti każijiet. ¬elluli li m'għandhomx attività metabolika intrinsika suffiċjenti għandhom ikunu esposti għall-kimika tat-test fil-preżenza u fl-assenza ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika xierqa. Fl-aħħar tal-perjodu għall-esposizzjoni, iċ-ċelluli jinħaslu mis-sustanza tat-test u jiġu kulturati għal żewġ dawriet ta' replika fil-preżenza ta' BrdU għall-ħim sħiħ tal-kultura ta' żewġ ċikli ta' ċelluli.

Kulturi tal-limfoċita tal-bnedmin huma trattati waqt li jkunu f'kondizzjoni semisinkronika.

Iċ-ċelluli huma analizzati fit-tieni diviżjoni tagħhom wara t-trattament, bl-assigurazzjoni li l-istadji taċ-ċikli taċ-ċelluli li huma l-iktar sensittivi kienu esposti għall-kimika. Il-kulturi kollha li huma miżjuda bil-BrdU għandhom ikunu ttrattati fid-dlam jew f'dawl baxx minn lampi inkandexxenti sal-ħsad taċ-ċelluli sabiex titnaqqas sal-minimu il-fotolisi ta' DNA li fiha l-BrdU.

Il-ħsad taċ-ċelluli

Il-kulturi taċ-ċelluli huma trattati b'inibitur tal-maghżel (eż. l-kolkiċina) bejn siegħa u erba' siegħat qabel il-ħsad. Kull kultura hija maħsuda u proċessata b'mod separat għall-preparazzjoni tal-kromosomi.

Il-preparazzjoni u t-tilwin tal-kromosomi

Il-preparazzjonijiet tal-kromosomi isiru permezz ta' tekniċi ċitoġenetiċi standard. It-tilwin ta' l-islajds biex juru l-SCEs jista' jsir b'bosta tekniċi, (eż. il-metodu tal-fluworexxenza flimkien ma' Giemsa).

L-Analiżi

In-numru ta' ċelluli analizzati għandu jkun ibbażat fuq il-frekwenza tal-kontroll spontanju ta' SCE. Is-soltu, għall-inqas 25 metafasi mqassmin sew għal kull kultura huma analizzati għal SCEs. L-islajds jingħataw kodiċi qabel l-analiżi. Fil-limfoċiti tal-bnedmin huma analizzati biss dawk il-metafasijiet li fihom 46 *centromeres*. F'razez ta' ċelluli stabbiliti huma analizzati biss il-metafasijiet li fihom ±2 ċentromeri tan-numru modali. Għandu jkun indikat jekk it-tibdil ċentromeriku tat-tikketta huwa mmarkat bħala SCE. Ir-riżultati għandhom ikunu konfermati f'esperiment indipendenti.

2. **ID-DATA**

Id-data għandha tkun ippreżentata f'forma ta' tabelli. In-numru ta' SCEs għal kull metafasi u n-numru ta' SCE's għal kull kromosoma għal kull metafasi għandhom jitniżżlu b'mod separat għall-kulturi kollha trattati u kontrollati.

Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi staitistiċi xierqa.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni il ġejja:

— Iċ-ċelluli użati, il-metodi użati biex jinżammu l-kulturi taċ-ċelluli,

— Il-kondizzjonijiet tat-test: il-komposizzjoni tal-mezzi, il-konċentrazzjoni ta' CO_2 il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, il-vettura użata, it-temperatura ta' l-inkubazzjoni, il-ħin tat-trattament, l-inibitur tal-magħżel użat, il-konċentrazzjoni tiegħu u t-tul tat-trattament bih, it-tip ta' sistema għall-attivazzjoni mammifera użata, kontrolli pożittivi u negattivi,

— In-numru ta' kulturi ta' ċelluli għal kull punt sperimentali,

— id-dettalji tat-teknika użata għall-preparazzjoni ta' l-islajds,

— in-numru ta' metafasijiet analizzati (id-data għandha tingħata separata għal kull kultura),

— il-medja tan-numru ta' SCE għal kull ċellula u għal kull kromosoma (id-data għandha tingħata separata għal kull kultura),

— il-kriterji biex jingħad SCE,

— ir-raġuni għall-għażla tad-doża,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-risposta, jekk tapplika,

— il-valutazzjoni statistika,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

TEST RE¬ESSIV LI JIKKAĠUNA L-MEWT U LI HUWA SKOND IS-SESS F'*DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4. **Il-prinċipju tal-metodu għat-test**

It-test reċessiv li jikkaġuna l-mewt u li huwa skond is-sess (SLRL) li juża d- *Drosophila melanogaster* josserva t-tibdil li jsir, kemm tibdil tal-punt kif ukoll thassir żgħir, fir-razza tal-mikrobu ta' l-insett. Dan it-test huwa analiżi tat-tibdil 'il-quddiem u huwa kapaċi isib tibdil f'madwar 800 post fuq il-kromosoma-X; Dawn jirrappreżentaw madwar 80% tal-postijiet tal-kromosoma-X. Il-kromosoma-X tirrappreżenta madwar wieħed minn ħamsa tal-ġenomu ta' l-aplojde kollu.

Tibdiliet fil-kromosoma-X tad-*Drosophila melanogaster* huma fenotipikament espressi fl-irġiel li jġorru l-ġene mutanti. Meta t-tibdil jikkaġuna l-mewt fil-kondizzjoni emizigota, il-preżenza tiegħu hija deduċibbli mill-assenza ta' waħda mill-klassijiet ta' frieħ tas-sess maskili miż-żewġ klassijiet li s-soltu jkunu prodotti minn mara eterożigota. It-test SLRL jieħu vantaġġ minn dawn il-fatti permezz ta' kromosomi mmarkati u rranġati b'mod speċjail.

1.5. **Kriterji għall-kwalità**

Xejn.

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Preparazzjonijiet

Stokk

Annimali tas-sess maskili ta' stokk tat-tip salvaġġ definit sew u annimali tas-sess femminili ta' l-istokk Muller-5 jistgħu jintużaw. Stokk femminili ieħor immarkat b'mod xieraq b'kromosomi multipli maqlubin jistgħu jintużaw ukoll.

Sustanza tat-test

Is-sustanzi tat-test għandhom ikunu maħlulin fl-ilma. Sustanzi li ma jinħallux fl-ilma jistgħu ikunu maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa (eż. taħlita ta' etanol u Tween-60 jew 80), u mbagħad jinħallu fl-ilma jew fl-ilma bil-melħ qabel ma jkunu amministrati. Id-Dimetilsulfossidu (DMSO) għandu jkun evitat bħala vettura.

In-numru ta' annimali

It-test għandu jkun iddiżinjat b'sensitività u saħħa predeterminata. Il-frekwenza ta' tibdil spontanju osservata fil-kontroll xieraq jinfluwenza b'mod qawwi in-numru ta' kromosomi trattati li għandhom ikunu analizzati.

Ir-rotta ta' l-amministrazzjoni

L-espożizzjoni tistà tkun orali, b'injezzjoni, jew bl-espożizzjoni għal gassijiet jew fwar. Meta s-sustanza tat-test tittiekel dan jista' jsir f'soluzzjoni taz-zokkor.

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Kontrolli negattivi (tal-vettura) u pożittivi għandhom ikunu inklużi. Madankollu, jekk tkun disponibbli data xierqa tal-laboratorju dwar kontroll storiku, m'humhiex meħtieġa kontrolli fl-istess ħin.

Livelli ta' espożizzjoni

Għandhom jintużaw tlett livelli ta' espożizzjoni. Għal stima preliminary jista' jintuża livell wieħed ta' espożizzjoni tas-sustanza tat-test, b'dak il-livell ta' espożizzjoni li jkun jew il-konċentrazzjoni massima tollerata jew dak li jipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità. Għal sustanzi li m'humhiex tossiċi għandha tintuża espożizzjoni għall-ogħla konċentrazzjoni prattikabbli.

Proċedura

L-annimali tas-sess maskili tat-tip salvaġġ (li jkollhom bejn tlieta u ħamest ijiem) huma trattati bis-sustanza u mgħammrin individwalment ma' eċċess ta' annimali femminili verġni mill-istokk Muller-5 jew minn stokk ieħor immarkat b'mod xieraq (b'kromosomi X multipli maqlubin). L-annimali femminili ikunu mibdula b'verġni ġodda kull jumejn jew tlett ijiem biex ikun kopert iċ-ċiklu kollu taċ-ċellula tal-mikrobu. Il-frieħ ta' dawn l-annimali femminili jiġu eżaminati għal effetti li jikkaġunaw il-mewt li jikkorrispondu ma' l-effetti fuq l-isperma matura, l-ispermatidi fi stadju medju jew tard, l-ispermatidi fi stadju kmieni, spermatoċiti u spermatogonji waqt it-trattament.

Annimali tas-sess femminili eterozigoti F_7 mill-qasmiet msemmija hawn fuq jitħallew jgħammru individwalment (jiġifieri, femminili waħda f'kull kunjett) ma' l-aħwa tagħhom. Fil-ġenerazzjoni F_7 kull kultura tiġI eżaminata għall-assenza ta' maskili tat-tip salvaġġ. Jekk ikun hemm kultura li tidher li telgħet minn femminili F_1 li kienet qed iġġorr letali fil-kromosoma X parentali (jiġifieri ma jkunux osservati maskili bil-kromosoma trattata) il-frieħ femminili ta' dak l-annimal femminili li għandhom l-istess ġenotip għandhom ikunu ttestjati biex ikun assigurat jekk dik il-possibilità li tikkaġuna l-mewt hijhiex ripetuta fil-ġenerazzjoni ta' wara.

2. ID-DATA

Id-data għandha tkun fil-forma ta' tabelli li juru n-numru ta' kromosomi-X ittestjati, in-numru ta' annimali maskili li m'humhiex fertili u n-numru ta' kromosomi li jikkaġunaw il-mewt f'kull konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni u għal kull perjodu ta' tgħammir għal kull maskil trattat. Għandhom ikunu rrappurtati numri ta' ġemgħat ta' daqsijiet differenti għal kull maskil. Dawn ir-riżultati għandhom ikunu kkonfermati f'esperiment separat.

Għandhom ikunu użati metodi statistiċi xierqa fil-valutazzjoni ta' testijiet reċessivi li jikkaġunaw il-mewt u li huma skond is-sess. It-tgħaqqid ta' letali reċessivi li joriġinaw minn maskil wieħed għandhom jitqiesu u jkunu evalwati b'mod statistiku xieraq.

3. IR-RAPPURTAĠĠ

3.1. Ir-rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni il ġejja:

— Stokk: l-istokk jew ir-razez ta' *Drosophilia* użati, iż-żmien ta' l-insetti, in-numru ta' annimali maskili trattati, in-numru ta' annimali maskili sterili, in-numru ta' kulturi F_2 stabbiliti, in-numru ta' kulturi F_2 mingħajr prodotti, in-numru ta' kromosomi li jġorru letali f'kull stadju taċ-ċellula tal-mikrobu,

— Il-kriterji biex ikun stabbilit id-daqs tal-gruppi trattati,

— Il-kondizzjonijiet tat-test: deskrizzjoni dettaljata ta' l-iskeda tat-trattament u tat-teħid tal-kampjuni, il-livelli ta' l-espożizzjoni, data dwar it-tossiċità, kontrolli negattivi (tas-solvent) u pożittivi, jekk xierqa,

— Il-kriterji biex jingħadd it-tibdil letali,

— ir-relazzjoni bejn l-espożizzjoni u l-effett fejn possibbli,

— valutazzjoni tad-data,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. REFERENZI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

TESTIJIET TAT-TRASFORMAZZJONI TAĊ-ĊELLULI MAMMIFERI *IN VITRO*

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjonii Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4. **Il-prinċipju tal-metodu għat-test**

Sistemi tal-kulturi taċ-ċelluli mammiferi jistgħu jintużaw biex ikunu skoperti bidliet feontipiċi *in vitro* ikkaġunati minn sustanzi kimiċi assoċjati mat-trasformazzjoni malinna *in vivo*. ¬elluli użati spiss jinkludu C3H10T½, 3T3, SHE, ġrieden Fischer u t-testijiet jiddependu fuq il-morfoloġija taċ-ċelluli, il-formazzjoni tal-fokus jew bidliet fid-dipendenza ta' ankoraġġ f'agar semi-solidu. Jeżistu sistemi użati b'mod inqas frekwenti li josservaw bidliet oħra fiżjoloġiċi jew morfoloġiċi fiċ-ċelluli wara l-espożizzjoni għal kimiċi karċinoġeniċi. L-ebda wieħed mill-punti finali tat-test *in vitro* m'għandu kollegament mekkanistiku stabbilit mal-kanċer. Uħud mis-sistemi tat-test huma kappaċi jiskopru promoturi tat-tumuri. Iċ-ċitotossiċità tistà tkun determinata billi jitkejjel l-effett tal-materjal tat-test fuq il-kapaċitajiet għall-formazzjoni ta' kolonji (effiċjenza ta' l-ikklonjar) jew ir-rati tat-tkabbir tal-kulturi. Il-kejl taċ-ċitotossiċità huwa biex jistabbilixxi li l-espożizzjoni għall-kimika tat-test kienet tossikoloġikament rilevanti iżda ma tistax tintuża għall-kalkolu tal-frekwenza tat-trasformazzjoni fl-analiżi kollha billi uħud minnhom jistgħu jinvolvu inkubazzjoni estiża u/jew *replating*.

1.5. **Kriterji tal-Kwalità**

Xejn

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu għat-test**

Preparazzjonijiet

Iċ-ċelluli

Hemm varjetà ta' razez ta' ċelluli jew ċelluli primarji li huma disponibbli skond it-test ta' trasformazzjoni li jkun qed isir. L-investigatur għandu jassigura li ċ-ċelluli fit-test li jkun qed isir jesibixxu l-bidla fenotipika xierqa wara l-espożizzjoni għal karċinoġeni magħrufa u li t-test, fil-laboratorju ta' l-investigatur, huwa ta' validità dokumentata u ta' min joqgħod fuqu.

Il-mezz

Għandhom ikunu użati mezzi u kondizzjonijiet sperimentali li huma xierqa għall-analiżi tat-trasformazzjoni użata.

Sustanza tat-test

Sustanzi tat-test jistgħu ikunu ppreparati f'mezzi għall-kultura jew maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa qabel it-trattament taċ-ċelluli. Il-konċentrazzjoni finali tal-vettura fis-sistema tal-kultura m'għandhiex taffettwa il-vijabilità tar-rata tat-tkabbir jew l-inċidenza tat-trasformazzjoni.

L-attivazzjoni metabolika

Iċ-ċelluli għandhom ikunu esposti għas-sustanza tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika adegwata. B'mod alternattiv, meta jintużaw tipi ta' ċelluli li għandhom attività metabolika intrinsika, in-natura ta' l-attività għandha tkun magħrufa li hija xierqa għall-klassi kimika li tkun qed tiġi ttestjata.

Kondizzjonijiet tat-test

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment kontrolli pożittivi li jużaw kemm kompost li jaġixxi b'mod dirett kif ukoll kompost li jeħtieġ attivazzjoni metabolika; għandu jintuża kontroll negattiv (vettura) ukoll.

Dawn li ġejjin huma eżempji ta' sustanzi li jistgħu jintużaw bħala kontrolli pożittivi:

— komposti attivi diretti:

  — etilmetansulfonat,

  — β-*propiolactone,*

— komposti li jeħtieġu attivazzjoni metabolika:

  — 2-aċetilamminofluworin,

  — 4-dimetilamminoażobenżina,

  — 7,12-dimetilbenżantraċene,

Meta xieraq, kontroll pożittiv addizzjonali ta' l-istess klassi kimika bħall-kompost fit-test għandu jkun inkluż.

Konċentrazzjonijiet ta' l-espożizzjoni

Għandhom jintużaw numru ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom joħolqu effett tossiku skond il-konċentrazzjoni, bl-ogħla konċentrazzjoni li toħloq livell baxx ta' sopravivenza u bis-sopravivenza fil-konċentrazzjoni l-iktar baxxa li tkun kważi l-istess daqs dik fil-kontroll negattiv. Komposti li relattivament ma jinħallux fl-ilma għandhom ikunu ttestjati sal-limiti ta' l-insolubilità tagħhom bl-użu tal-proċeduri xierqa. Għal sustanzi li jinħallu faċilment fl-ilma u li m'humhiex tossiċi, l-ogħla konċentrazzjoni tal-kimika tat-test għandha tkun determinata skond il-każ.

Proċedura

Iċ-ċelluli għandhom ikunu esposti għal perjodu ta' ħin xieraq li jiddependi fuq is-sistema tat-test li tintuża, u dan jista' jinvolvi id-dożaġġ mill-ġdid flimkien ma' mezz (u jekk meħtieġ, taħlita ġdida għall-attivazzjoni metabolika) jekk l-espożizzjoni tiġi mtawwla. Iċ-ċelluli mingħajr attività metabolika intrinsika suffiċjenti għandhom ikunu esposti għas-sustanza tat-test fil-preżenza u fl-assenza ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika xierqa. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, iċ-ċelluli jinħaslu mis-sustanza tat-test u huma kkulturati f'kondizzjonijiet xierqa għad-dehra tal-fenotip trasformat li jkun qed jiġi kkontrollat u l-inċidenza tat-trasformazzjoni determinata. Ir-riżultati kollha huma kkonfermati f'esperiment indipendenti.

2. ID-DATA

Id-data għandha tkun ippreżentata f'forma ta' tabelli u tista' tieħu diversi forom skond l-analiżi li tkun qed issir eż. l-għadd tal-platti, platti pożittivi jew numri ta' ċelluli trasformati. Fejn huwa xieraq, is-sopravivenza għandha tkun espressa bħala perċentwali tal-livelli tal-kontroll u l-frekwenza tat-trasformazzjoni għandha tkun espressa bħala n-numru ta' trasformanti għal kull numru ta' sopraviventi. Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa.

3. IR-RAPPURTAĠĠ

3.1. Ir-rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni li ġejja:

— It-tip ta' ċelluli użati, in-numru ta' kulturi ta' ċelluli, il-metodi użati biex jinżammu l-kulturi taċ-ċelluli,

— Il-kondizzjonijiet tat-test: il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, il-vettura użata, il-ħin ta' l-inkubazzjoni, it-tul u l-frekwenza tat-trattament, id-densità taċ-ċelluli waqt it-trattament, it-tip ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika esoġena użata, kontrolli pożittivi u negattivi, l-ispeċifikazzjoni tal-fenotip li jkun qed jiġi kkontrollat, is-sistema selettiva użata (jekk xieraq), ir-raġuni għall-għażla tad-doża,

— Il-metodu użat għall-enumerazzjoni taċ-ċelluli vijabbli u trasformati,
— valutazzjoni statistika,
— id-diskussjoni tar-riżultati,
— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

TEST LETALI DOMINANTI TAL-MAMMALI ĠERRIERA

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjonii Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4. **Il-prinċipju tal-metodu għat-test**

Effetti letali dominanti jikkawżaw il-mewt embrijonika jew tal-fetu. L-induzzjoni ta' letali dominanti bl-esposizzjoni għal sustanza kimika tindika li s-sustanza affetwat it-tessut ġerminali ta' l-ispeċi tat-test. Huwa aċċettat b'mod ġenerali li l-letali dominanti huma dovuti għad-dannu kromosomali (anomaliji strutturali u numeriċi). Il-mewt embrijonika jekk ikunu trattati l-annimali femminili tista' tkun ukoll riżultat ta' l-effetti tossiċi.

Ġeneralment, l-annimali tas-sess maskil huma esposti għall-kompost tat-test u mgħammra ma' annimali tas-sess femminili li huma verġni u li m'humhiex trattati. Id-diversi stadji taċ-ċellula tal-mikrobu jistgħu ikunu ttestjati b'mod separat bl-użu ta' intervalli sekwenzali fit-tgħammir. 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-telfa ta' wara l-impjantazzjoni. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni tista' tkun stimata fuq il-bażi ta' l-għadd *corpora lutea* jew billi jitqabblu l-impjanti totali f'kull waħda tas-sess femminili fil-gruppi trattati u tal-kontroll. L-effett letali dominanti totali huwa t-total tat-telf ta' qabel u ta' wara l-impjantazzjoni. Il-kalkolu ta' l-effett letali dominanti totali huwa bbażat fuq it-tqabbil ta' impjanti ħajjin f'kull waħda mis-sess femminili fil-grupp tat-test ma' l-impjanti ħajjin f'kull waħda mis-sess femminili fil-grupp tal-kontroll. Tnaqqis fin-numru ta' impjanti f'ċerti intervalli jista' jkun ir-riżultat tal-qtil ta' ċelluli (jiġifieri spermatoċiti u/jew spermatogonji).

1.5. **Kriterji tal-Kwalità**

Xejn

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu għat-test**

Preparazzjonijiet

Meta possibbli, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu maħlula jew sospiżi f'soluzzjoni mielħa isotonika. Kimiċi li ma' jinħallux fl-ilma jistgħu ikunu maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa. Il-vettura użata m'għandhiex tfixkel il-kimika tat-test u lanqas m'għandha tipproduċi effetti tossiċi. Preparazzjonijiet ġodda tal-kimika tat-test għandhom ikunu użati.

Kondizzjonijiet tat-test

Rotta ta' l-amministrazzjoni

Ġeneralment il-kompost tat-test għandu jkun amministrat darba biss. Tista' tkun użata skeda ta' trattament ripetuta bbażata fuq informazzjoni tossikoloġika. Ir-rotot normali għall-amministrazzjoni huma l-intubazzjoni orali jew l-injezzjoni fil-peritonew. Rotot oħrajn għall-amministrazzjoni jistgħu ikunu xierqa.

Annimali sperimentali

Ġrieden u firien huma rrakkommandati bħala speċI tat-test. Annimali kompletament maturi fis-sens sesswali u b'saħħithom huma magħżulin bl-addoċċ u assenjati f'gruppi għat-trattament u gruppi tal-kontroll.

In-numru u s-sess

Għandu jintuża numru adegwat mis-sess maskili li huma trattati, u għandu jittieħed qies tal-varjazzjoni spontanja tal-karattru bijoloġiku li jkun qiegħed jiġI evalwat. In-numru magħżul għandu jkun ibbażat fuq is-sensitività pre-determinata ta' l-osservazzjoni u l-qawwa tas-sinifikazzjoni. Per eżempju f'test tipiku, in-numru ta' annimali tas-sess maskili f'kull grupp ta' doża għandu jkun biżżejjed biex jipprovdu bejn 30 u 50 annimali nisa' tqal f'kull intervall ta' tgħammir

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Ġeneralment għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment kontrolli pożittivi u negattivi (vettura). Meta jkunu disponibbli riżultati ta' kontrolli pożittivi minn esperimenti li saru reċentement fl-istess laboratorju dawn ir-riżultati jistgħu jintużaw minflok kontroll pożittiv fl-istess ħin. Sustanzi ta' kontroll pożittiv għandhom jintużaw f'doża baxxa xierqa (eż. MMS, fil-peritonew, f'10 mg/kilogramma) biex tkun murija s-sensitività tat-test.

Livell tad-doża

Normalment, għandhom jintużaw tliet livelli ta' doża. Id-doża l-għolja għandha tipproduċi sinjali ta' tossiċità jew fertilità mnaqqsa f'annimali trattati. F'ċerti każijiet doża waħda ta' livell għoli tistà tkun suffiċjenti.

Test tal-limitu

Sustanzi li m'humhiex tossiċi għandhom ikunu ttestjati b' 5 g/kilogramma b'amministrazzjoni waħda jew b' 1 g/kilogramma/jum b'amministrazzjoni ripetuta.

Proċedura

Bosta skedi ta' trattament huma disponibbli. L-iktar użata hija l-amministrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test. Jistgħu jintużaw skedi oħrajn tat-trattament.

Annimali individwali tas-sess maskil huma mgħammrin sekwenzalment ma' waħda jew żewġ annimali tas-sess femminili li huma verġni u li m'humhiex trattati, f'intervalli xierqa wara t-trattament. Annimali femminili għandhom jitħallew ma' dawk maskili għall-inqas għat-tul ta' ciklu estrus wieħed jew sakemm iseħħ it-tgħammir kif determinat bil-preżenza ta' l-isperma fil-vaġina jew bil-preżenza ta' tapp vaġinali.

In-numru ta' tgħammir wara t-trattament huwa ggvernat bl-iskeda tat-trattament u għandu jassigura li jkun hemm kampjun ta' l-istadji kollha taċ-ċelluli tal-mikrobu wara t-trattament.

L-annimali femminili huma sagrifikati fit-tieni parti tat-tqala u l-kontenut ta' l-utru huwa eżaminat biex ikun determinat in-numru ta' impjanti mejtin u ħajjin. L-ovarji jistgħu ikunu eżaminati biex ikun determinat in-numru ta' *corpora lutea*.

2. **ID-DATA**

Id-data għandha tkun f'forma ta' tabelli biex turi n-numru ta' annimali maskili, in-numru ta' femminili tqal, u n-numru ta' annimali femminili li m'humhiex tqal. Ir-riżultati ta' kull tgħammir, inkluża l-identità ta' kull animal maskil u feeminili. Għandhom ikunu rrappurtati b'mod individwali. Għal kull animal femminili, il-ġimgħa tat-tgħammir, il-livell tad-doża li ngħatat lill-annimal maskil, il-frekwenza ta' impjanti ħajjin u ta' impjanti mejtin għanhom ikunu imniżżla.

Il-kalkolu ta' l-effett letali dominanti totali huwa bbażat fuq it-tqabbil ta' l-impjanti ħajjin għal kull annimal femminili fil-grupp tat-test ma' l-impjanti ħajjin għal kull animal femminili fil-grupp ta' kontroll. Il-proporzjon ta' l-impjanti mejtin għal dawk ħajjin mill-grupp tat-trattament mqabbel ma' l-istess proporzjon mill-grupp tal-kontroll huwa analizzat biex juri t-telf ta' wara l-impjantazzjoni.

Jekk id-data tkun imniżżla bħala mewt kmieni jew tard, it-tabelli għandhom jagħmluha ċara. Jekk it-telf ta' qabel l-impjantazzjoni ikun stimat, għandu jkun irrappurtat. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni jista' jkun ikkalkulat bħala diskrepanza bejn in-numru ta' *corpora lutea* u n-numru ta' impjanti jew bħala tnaqqis in-numru medju ta' impjanti għal kull uteru meta mqabbel ma' tgħammir ta' kontroll.

Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni li ġejja:

— L-ispeċi, ir-razza, iż-żmien u l-piż ta' l-annimali użati, in-numru ta' annimali ta' kull sess fil-gruppi ta' sperimentazzjoni u kontroll,

— Is-sustanza tat-test, il-vettura, il-livelli tad-doża ttestjati u r-raġuni għall-għażla tad-doża, kontrolli pożittivi u negattivi, data dwar it-tossiċità,

— Ir-rotta u l-iskeda tat-trattament,

— L-iskeda tat-tgħammir,

— Il-metodu użat biex ikun determinat li sar it-tgħammir,

— Il-ħin tas-sagrifiċċju,

— Il-kriterji biex jingħaddu letali dominanti,

— Ir-relazzjoni bejn id-doża u r-risposta, jekk tapplika,

— valutazzjoni statistika,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

ĊITOĠENETIKA TAĊ-ĊELLULI TAL-MIKROBI MAMMIFERI *IN VIVO*

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjonii Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4. **Il-prinċipju tal-metodu għat-test**

Dan it-test ċitoġenetiku *in vivo* josserva aberrazzjonijiet strutturali tal-kromosomi fl-ispermatogonji. Jikkonsisti f'analiżi tal-mitosi ta' l-ispermatogonji għall-aberrazzjonijiet ta-tipi tal-kromatid u tal-kromosoma.

Il-metodu juża l-preparazzjoni ta' testikoli ta' mammiferi li kienu esposti għall-kimiċi tat-test permezz ta' rotot xierqa u sagrifikati f'intervalli li jvarjaw. L-annimali ikomplu jiġu trattati, qabel ma jkunu sagrifikati, b'inibituri tal-magħżel bħall-kolkiċina biex ikunu akkumulati ċ-ċelluli f'stadju bħall-metafasi tal-mitosi (metafasi-c). Isiru preparazzjonijiet tal-kromosomi mnixxfin bl-arja, jiġu mlewwnin u mbagħad analizzati bil-mikroskopju.

L-analiżi ta' l-ispermatoċiti fil-metafasi-diakinesis 1 għat-traslok multivalenti wara t-trattament taċ-ċelluli ta' l-għerq tista' tipprovdi informazzjoni addizzjonali utli.

1.5. **Kriterji tal-Kwalità**

Xejn

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu għat-test**

Preparazzjonijiet

Il-kimiċI tat-test għandhom ikunu maħlula f'soluzzjoni mielħa isotonika. Jekk ma jinħallux, jiġu maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa. Soluzzjonijiet preparati mill-ġdid tal-kompost tat-test għandhom ikunu użati. Jekk tintuża vettura biex tiffaċilita d-dożaġġ, m'għandhiex tfixkel il-kimika tat-test jew tipproduċi effetti tossiċi.

Rotta ta' l-amministrazzjoni

Ġeneralment il-kompost tat-test għandu jkun amministrat darba biss. Tista' tkun użata skeda ta' trattament ripetuta bbażata fuq informazzjoni tossikoloġika. Madankollu, it-trattament ripetut jista' jkun applikat biss jekk il-kompost tat-test ma jurix effetti ċitotossiċi kbar fl-ispermatogonji differenti.

Ir-rotot normali għall-amministrazzjoni huma l-intubazzjoni orali jew l-injezzjoni fil-peritonew. Rotot oħrajn għall-amministrazzjoni jistgħu ikunu xierqa.

Annimali sperimentali

Il-ġrieden u l-ħamsters Ciniżi l-iktar li jintużaw b'mod komuni. Tista' tinutża kull speċi mammifera oħra.

Annimali maskili kompletament maturi fis-sens sesswali jintużaw u jiġu assenjati kif ġie ġie f'gruppi għat-trattament u gruppi tal-kontroll.

In-numru ta' annimali

Għandhom jintużaw għall-inqas ħames annimali tas-sess maskil għal kull grupp sperimentali u ta' kontroll

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment kontrolli pożittivi u negattivi (vettura).

Sustanzi ta' kontroll pożittiv għandhom ikunu użati f'doża baxxa xierqa (eż. mitomycin C, fil-peritonew, f'0,3 mg/kilogramma) biex tkun murija s-sensitività tat-test.

Livell tad-doża

Doża waħda tal-kompost tat-test hija użata, u din id-doża għandha tkun l-ogħla doża tollerata jew dik li tipproduċi xi indikazzjoni ta' ċitotossiċità. Jekk din id-doża tipproduċi qtil għoli taċ-ċelluli għandha tintuża doża addizzjonali iktar baxxa li turi ċ-ċitotossiċità. Meta jeħtieġ li tkun stabbilita relazzjoni bejn id-doża u r-risposta għall-inqas tlett dożi huma meħtieġa (eż. biex tkun ikkonfermata risposta pożittiva dgħajfa). Sustanzi li m'humhiex tossiċi għandhom ikunu ttestjati bl-ogħla doża prattikabbli kemm għall-amministrazzjoni waħda kif ukoll għal dik ripetuta.

Proċedura

Ġeneralment l-annimali huma trattati bil-kompost tat-test darba waħda biss. Fil-grupp ta' l-ogħla doża jintużaw tlett intervalli għat-teħid ta' kampjuni wara t-trattament. L-intervall ċentrali għall-kampjuni huwa ta' 24 siegħa. Billi l-kinetika taċ-ċiklu taċ-ċelluli tista' tkun influwenzata mill-kompost tat-test, huma applikati intervall iktar kmieni u ieħor iktar tard mqassmin b'mod adegwat fil-medda ta' 6 sa 48 siegħa. Għal livelli ta' doża addizzjonali għandhom jittieħdu kampjuni fl-intervall partikolarment sensittiv, jew, jekk dak m'huwhiex magħruf, 24 siegħa wara t-trattament.

B'mod alternattiv, tista' tintuża skeda ta' trattament ripetut u l-annimali għandhom ikunu sagrifikati 24 siegħa wara l-aħħar trattament. Jistgħu jintużaw ħinijiet addizzjonali għat-teħid ta' kampjuni fil-medda ta' bejn 6-24 siegħa.

Preparazzjoni tat-testikolu

Għall-analiżi ta' mitosi ta' l-ispermatogonji l-annimali huma injettati fil-peritonew b'doża adegwata ta' inibitur tal-magħżel bħall-kolkiċina. L-annimali huma sagrifikati wara interval xieraq wara l-injezzjoni. Għall-ġrieden dan l-intervall ivarja bejn tlieta u ħames siegħat, għall-ħamsters Ċiniżi jistgħu ikunu meħtieġa iktar minn ħames siegħat.

Hija użata it-teknika tat-tnixxif bl-arja. Speċi differenti jistgħu jeħtieġu modifiki tal-proċedura standard. Sospensjonijiet taċ-ċelluli jinkisbu, jiġu trattati b'soluzzjoni ipotonika u mwaħħla. Iċ-ċelluli jiġu mifruxin fuq slajds u mlewwnin. L-islajds jingħataw kodiċi qabel l-analiżi bil-mikroskopju.

Analiżi

Għall-inqas 100 metafasi mitotika mqassmin tajjeb bin-numru komplet ta' ċentromeri huma analizzati għal aberrazzjonijiet strutturali tal-kromosomi. Barra minn hekk, il-proporzjon ta' mitosi ta' l-ispermatogonji għall-ewwel u t-tieni metafasi mejotiċi jista' jkun determinat f'kampjun totali ta' 100 ċellula diviżorja għal kull animal biex ikun stabbilit effett possibbli ċitotossiku.

2. **ID-DATA**

Id-data għandha tkun ippreżentata fil-forma ta' tabelli. Għal kull animal ta' kontroll u kull animal trattat llkull tip ta' aberrazzjoni hija mniżżla b'mod separat. In-numru totali ta' ċelluli analizzati u n-numru totali ta' ċelluli aberranti f'kull grupp huma inklużi. Il-mezzi u d-devjazzjoni standard għandhom jingħataw għall-parametri kollha. Jekk ikun determinat, il-proporzjon medju tal-mitosi ta' l-ispermatogonji għall-ewwel u t-tieni metafasijiet mejotiċi huwa mqiegħed fit-tabelli għal kull grupp sperimentali u ta' kontroll.

Id-data għandha tkun evalwata bl-użu ta' metodi statistiċI xierqa.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni li ġejja:

— L-ispeċi u r-razza ta' l-annimali tas-sess maskili, iż-żmien u l-piż ta' l-annimali maskili,

— in-numru ta' annimali f'kull grupp ta' sperimentazzjoni u kontroll,

— kondizzjonijiet tat-test, deskrizzjoni dettalljata tat-trattament, il-livelli tad-doża, is-solventi, l-inibitur tal-magħżel użat,

— in-numru ta' ċelluli analiżżati għal kull animal f'kull grupp,

— għal kull animal trattat u ta' kontroll: it-tipi u n-numri ta' l-aberrazzjonijiet,

— il-valutazzjoni statistika,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

TEST TAT-TIKEK FIL-PIL TAL-ĠRIEDEN

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. **Tifsira**

Ara l-Introduzzjonii Ġenerali Parti B.

1.3. **Sustanzi għar-referenza**

Xejn.

1.4. **Il-prinċipju tal-metodu għat-test**

Dan huwa test *in vivo* tal-ġrieden li fih l-embriju li jkun qed jiżviluppa jkun espost għall-kimika. Iċ-ċelluli li għalihom huwa mmirat it-test fl-embrija li jkun ċed jiżviluppa huma l-*melanoblasts*, u l-ġeni mmirati huma dawk li jikkontrollaw il-pigmentazzjoni tal-pil. L-embriji li jkunu qed jiżviluppaw huma eterozigoti għal numru ta' dawn il-ġeni tal-kulur tal-pil. Tibdil fil-, jew telf ta' (b'varjetà ta' eventi ġenetiċi), l-allel dominanti ta' din il-ġene f'*melanoblast* jirriżulta fl-espressjoni tal-fenotip reċessiv fiċ-ċelluli dixxendenti, li tikkostitwixxi tikka ta' kulur mibdul fil-pil tal-ġurdien li jirriżulta. In-numru ta' frieħ b'dawn it-tikek, tibdil, jingħadd u l-frekwenza tagħhom hija mqabbla ma' dik fost il-frieħ li jirriżultaw minn embriji trattati bis-solvent biss. It-test tal-ġrieden għat-tikek josserva tibdil somatiku preżunt fiċ-ċelluli tal-fetu.

1.5. **Kriterji tal-Kwalità**

Xejn

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu għat-test**

Preparazzjonijiet

Meta possibbli, il-kimiċi tat-test għandhom ikunu maħlula jew sospiżi f'soluzzjoni mielħa isotonika. Kimiċi li ma jinħallux fl-ilma jiġu maħlula jew sospiżi f'vetturi xierqa. Il-vettura użata m'għandhiex tfixkel il-kimika tat-test jew tipproduċi effetti tossiċi. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda tal-kimika tat-test.

Annimali sperimentali

Il-ġrieden tar-razza T (*nonagouti,* a/a; ċinċilla, ta' l-għajn roża, $c^{ch}p/c^{ch}p$; kannella, b/b; dilwiti, ta' widnejhom qosra, d se/d se; animal b'tikek fil-pil ta' żewġ ilwien, s/s) huma mgħammra jew mar-razza HT (pallidi, *nonagouti,* brakjopodi, pa a bp/pa a bp; tentuxi griż, ln fz/ln fz; perla pe/pe) jew ma' C57 BL (*nonagouti,* a/a). Qasmiet xierqa oħrajn bħal bejn NMRI (*nonagouti,* a/a; albino, c/c) u DBA (*nonagouti,* a/a; kannella, b/b; dilwiti d/d) jistgħu jintużaw jekk jipproduċu frieħ *nonagouti*.

In-numru u s-sess

Għandhom ikunu trattati biżżejjed annimali femminili tqal biex jipprovdu numru xieraq ta' frieħ li jgħixu għal kull livell tad-doża użata. Id-daqs xieraq tal-kampjuni huwa skond in-numru ta' tikek osservat fil-ġrieden trattati u l-iskala ta' data ta' kontroll. Riżultat negattiv huwa aċċettabbli biss meta jingħaddu għall-inqas 300 ferħ minn annimali tas-sess femminili trattati bl-ogħla doża.

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

Għandha tkun disponibbli data ta' kontroll fl-istess ħin minn ġrieden trattati bil-vettura biss (kontrolli negattivi). Data storika ta' kontroll mill-istess laboratorju jista' jintuża biex tiżdied is-sensitività tat-test jekk ikunu omoġenji. Data ta' kontroll pożittiv miksuba reċentement fl-istess laboratorju għal trattament b'kimika magħrufa li turi l-mutaġeniċità b'dan it-test għandha tkun disponibbli jekk l-ebda mutaġeniċità tal-kimika tat-test ma tkun osservata.

Rotta ta' l-amministrazzjoni

Ir-rotot normali ta' l-amministrazzjoni huma l-intubazzjoni orali jew l-injezzjoni fil-peritonew ta' l-annimali tas-sess femminili li huma tqal. It-trattament permezz tat-teħid bin-nifs jew rotot oħra ta' l-amministrazzjoni huma użati meta xierqa.

Livelli tad-doża

Huma użati għall-inqas żewġ livelli tad-doża inkluża waħda li turi sinjali ta' tossiċità jew daqs iżgħar tal-boton. Għal kimiċi li m'humhiex tossiċi għandha tkun użata espożizzjoni għall-ogħla doża prattikabbli.

Proċedura

Ġeneralment jingħata trattament wieħed fil-ġurnata 8, 9 jew 10 tat-tqala, u l-ġurnata meta kien osservat it-tapp vaġinali għall-ewwel darba tingħadd bħala ġurnata waħda. Dawn il-ġranet jikkorrispondu ma' 7,25, 8,25, u 9,25 ġurnata wara l-konċepiment. Jistgħu jintużaw trattamenti suċċessivi f'dawn il-ġranet.

Analiżi

Il-frieħ jingħataw kodiċi u jiġu eżaminati għat-tikek bejn tlieta u erba' ġimgħat wara t-twelid. Hemm tlett klassijiet ta' tikek li jingħażlu:

(a) tikek bojod sa 5 mm mil-linja f'nofs iż-żaqq li huma preżunti li jirriżultaw mill-qtil taċ-ċelluli (WMVS);

(b) tikek sofor, li jixbħu lill-*agouti*, assoċjati mal-*mammae*, l-organi ġenitali, il-griżmejn, mal-partijiet ta' l-abt u ingwinali u f'nofs il-moħħ, li huma preżunti li jirriżultaw mill-middivrenzar (MDS); u

(c) tikek pigmentati u bojod mqassmin bl-addoċċ fuq il-pil li huma preżunti li jirriżultaw minn tibdil somatiku (RS).

It-tlett klassijiet huma eżaminati kollha imma l-aħħar klassi biss, RS, hija ta' rilevanza ġenetika. Problemi ta' distinzjoni bejn MDS u RS jistgħu ikunu solvuti permezz ta' mikroskopija fluworixxenti ta' kampjuni tax-xagħar tal-pil.

Anormalitajiet morfoloġiċi kbar li huma ovvji tal-frieħ għandhom ikunu nnotati.

2. ID-DATA

Id-data għandha tkun ippreżentata bħala numru totali ta' frieħ eżaminati u n-numru ta' dawk li għandhom tikka waħda jew iżjed li huma preżunti li huma tikek tat-tibdil somatiku. Data tat-trattament u tal-kontroll negattiv huma mqabbla permezz ta' metodi xierqa. Id-data hija ppreżentata ukoll fuaq bażi skond il-boton.

3. IR-RAPPURTAĠĠ

3.1. Ir-rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandhu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni il ġejja:

— ir-razez ta' l-annimali użati fil-qsim,

— in-numru ta' annimali femminili tqal fil-grupp ta' sperimentazzjoni u ta' kontroll,

— Id-daqs medju tal-boton tal-frieħ fil-gruppi ta' sperimentazzjoni u ta' kontroll fil-ħin tat-twelid u fil-ħin tal-ftim,

— Il-livell/livelli tad-doża tal-kimika tat-test,

— Is-solvent użat,

— Il-ġurnata tat-tqala li fiha ngħata t-trattament,

— Ir-rotta tat-trattament,

— In-numru totali ta' frieħ eżaminat, u n-numru li għandhom WMVS, MDS u RS fil-gruppi ta' sperimentazzjoni u ta' kontroll,

— Anormalitajiet morfoloġiċI kbar,

— Ir-relazzjoni bejn id-doża u r-risposta ta' l-RS meta possibbli

— valutazzjoni statistika,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

IT-TRASLOKAZZJONI TAL-ĠRIEDEN LI TITTIEĦED

1. **METODU**

1.1 **Introduzzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2 **Definizzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3 **Is-sostanzi tar-Referenza**

L-ebda.

1.4 **Il-prinċipju tal-metodu tat-test**

It-test tat-traslokazzjoni tal-ġrieden li tittieħed jiskopri it-tibdiliet strutturali u numeriċi fil-kromożomi fiċ-ċelloli mammarji tal-mikrob kif rkuprati fil-wild ta' l-annimali ta' l-ewwel ġenerazzjoni. It-tipi ta' tibdiliet fil-kromożomi skoperti huma traslokazzjonijiet reċiproċi u, jekk il-wild femminili jkunu inklużi, it-telf tal-kromożom-X. Dawk li jġorru t-traslokazzjonijiet u il-femminili-XO juru fertilità mnaqqsa li hija użata biex jintgħażel il-wild ta' l-annimali F1 għall-analiżi ċitoġenetika. L-isterilità kompleta hija kkawżata minn ċerti tipi ta' traslokazzjonijiet (*X-autosome* u tat-tip c-t). It-traslokazzjonijiet huma osservati ċitoġenetikament fiċ-ċelloli mejotiċi fil-metafaži tad-dijakinesi I ta' l-individwi maskili, jew irġiel F1jew il-wild irġiel tan-nisa F1. In-nisa-XO huma ċitoġenetikament identifikati mill-presenza ta' 39 kromożomi biss fil-mitosi tal-mudullun ta' l-għadma.

1.5 **Il-kriterju tal-kwalità**

L-ebda.

1.6 **Id-deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

Il-preparazzjonijiet

Il-kimiċi tat-testijiet huma maħlulin fl-ilma tal-melħ isotoniku. Jekk ikunu insolubbli dawn jiġu maħlula jew sospiżi fil-vetturi adattati. Is-soluzzjonijiet ippreparati friski tal-kompost tat-test jiġu wżati. Jekk vettura hija wżata biex ikun faċilitat id-dosaġġ, dan m'għandu ifixkel il-kompost tat-test jew jipproduċi effetti tossiċi.

Il-mod ta' l-amministrazzjoni

Il-modi ta' l-amministrazzjoni huma normalment intubazzjoni orali jew injezzjoni fil-peritonew. Il-modi l-oħra ta' l-amministrazzjoni jistgħu jkunu adattati.

L-annimali ta' l-esperimentazzjoni

Biex ikunu faċilitat it-tagħmir u l-verifikazzjonijiet ċitoloġika dawn l-esperimenti huma magħmula fuq il-ġrieden. L-ebda razza ta' ġurdin m'hija meħtieġa. Madanakollu, il-medja tad-daqs tal-boton tar-razza għandu jkun aktar minn tmienja u għandu jkun relattivament kostanti. Annimali b'saħħithom u maturi sesswalment huma wżati.

In-numru ta' l-annimali

In-numru ta' l-annimali neċessarju jiddependi fuq il-frekwenza spontanja tat-traslokazzjoni u r-rata minima ta' induzzjoni meħtieġa għal riżultati pożittivi.

It-test huwa normalment magħmul permezz ta' analiżi tal-wild irġiel F1. Minn ta' l-anqas 500 wild irġiel F1 għandhom ikunu ttestjati għal kull grupp ta' doża. Jekk il-wild nisa F1 ikunu nklużi, 300 raġel u 300 mara huma meħtieġa.

L-użu tal-kontrolli negattivi u pożittivi

Id-data adattata tal-kontroll, miksuba mill-kontroll konkorrenti u storiku għandha tkun disponibbli. Meta' r-riżultati pożittivi aċċettabbli tal-kontroll huma disponibbli mill-esperimenti magħmula riċentement fl-istess laboratorju dawn ir-riżultati jistgħu jkunu wżati minflok il-kontroll konkorrenti pożittiv.

Il-livelli tad-doża

Il-livell wieħed tad-doża huwa ttestjat, normalment l-għola doża assoċċjata mal-produzzjoni ta' l-effetti tossiċi minimi, iżda mingħajr ma' taffettwa l-aġir riproduttiv jew is-soppravivenza. Biex tkun stabbilita relazzjoni doża/rispons żewġ dożi addizzjonali aktar baxxi huma meħtieġa. Għall-kimiċi li mhumiex tossiċi l-esposizzjoni għad-doża massima prattikabbli għandhu tkun użata.

Il-proċedura

It-trattament u t-tgħammir

Żewġ ċedoli ta' trattament huma disponibbli. L-amministrazzjoni waħda tas-sostanzi tat-test hija dik l-aktar użata. L-amministrazzjoniji tas-sostanza tat-test fuq seba' t'ijiem fil-ġimgħa għal 35 ġurnata tista' wkoll tkun użata. In-numri ta' tgħammiriet wara t-trattament huma kontrollati miċ-ċedola tat-trattament u għandu jiżgura li kull stadju taċ-ċellola tal-mikrobu trattata jkun meħud kampjun minnu. Fl-aħħar tal-perjodu tat-tgħammir in-nisa jiġu msakkra f'gaġeġ separati. Meta' n-nisa jwelldu, id-data, id-daqs tal-boton u s-sess tal-wild għandhom ikunu rekordjati. L-ulied irġiel kollha jinfatmu u l-ulied nisa huma mormija sakemm dawn ma jkunux inklużi fl-esperiment.

L-ittestjar għat-traslokazzjoniji eterożigożita'

Wieħed miż-żewġ metodi possibli huwa wżat:

— L-ittestjar tal-fertilità ta' l-ulied F1 u l-verifikazzjoni sussegwenti ta' dawk li possibilment iġorru t-traslokazzjoni bl-analiżi ċitoġenetika,

— L-analiżi ċitoġenetika ta' l-ulied irġiel F1 kollha mingħajr għażla minn qabel bl-ittestjar tal-fertilità.

(a) L-ittestjar tal-fertilità

Il-fertilità mnaqqsa ta'l-individwu F1 tista' tkun stabbilita bl-osservazzjoni tad-daqs tal-boton u/jew l-analiżi tal-kontenut ta' l-utru tas-sieħba nisa.

Il-kriterji biex tkun determinata l-fertilità normali u mnaqqsa għandhom ikunu stabbiliti għar-razza tal-ġrieden użata.

L-osservazzjoni tad-daqs tal-boton: L-irġiel F1 li għandhom ikunu ttestjati għandhom ikunu maqfula ġo gaġeġ individwalment man-nisa jew mill-istess esperiment jew mill-kolonja. Il-gaġeġ huma spezzjonati kuljum mit-18 il-ġurnata wara t-tgħammir. Id-daqs tal-boton u s-sess ta' l-ulied F2 huma rrekordjati mal-wild u l-botnijiet huma mormija minn dak in-nhar 'l hemm. Jekk l-ulied nisa F1 ikunu ttestjati l-ulied F2 tal-botnijiet iż-żgħar huma miżmuma għall-aktar testijiet. Dawk li jġorru t-traslokazzjoni u huma nisa huma verifikati bl-analiżi ċitoġenetika għal traslokazzjoni fi kwalunkwe mill-ulied irġiel tagħhom. In-nisa-XO huma magħrufa mill-bidla fir-rata mqabbla tas-sess fost l-ulied tagħhom minn 1:1 sa 1:2 irġiel vs. nisa. Fil-proċedura sekwenzali, l-annimali normali F1 huma eliminati minn aktar testijiet jekk l-ewwel boton F2 jilħaq jew jaqbeż il-valur normali predeterminat, altrimenti boton it-tieni jew it-tielet boton F2 huwa osservat.

L-annimali F1 li ma jistgħux ikunu klassifikati bħala normali wara l-osservazzjoni ta' sa tlett botnijiet F2 jiġu jew ittestjati aktar bl-analiżi tal-kontenut ta' l-utru tas-sieħba nisa jew direttament soġġetti għall-analiżi ċitoġenetika.

L-analiżi tal-kontenut ta' l-utru: It-tnaqqis fid-daqs tal-boton ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni huwa minħabba għall-mewt embrijonika u għalhekk numru kbir ta' impjanti mejta huwa indikattiv tal-preżenza tat-traslokazzjoni fl-annimal li qed jiġi ttestjat. L-irġiel F1 li għandhom ikunu ttestjati għandhom ikunu mgħammra ma' tnejn jew tlett nisa kull wieħed. Il-konċepiment huwa stabbilit bl-ispezzjoni ta' kuljum għall-plakek tal-vaġina kull filgħodu. In-nisa huma sakrifikati minn 14 sa 16 il-jum wara u l-impjanti ħajjin u mejtin fl-utri tagħhom huma rekordjati.

(b) L-analiżi ċitoġenetika

Il-preparazzjonijiet tat-test huma magħmula bit-teknika tat-tnixxif bl-arja. Dawk li jġorru t-traslokazzjoni huma identifikati bil-presenza ta' konfigurazzjonijiet multivalenti fil-metfażi dijakinesi I fl-ispermatoċiti primarji. L-osservazzjoni ta' mill-anqas żewġ ċelloli bl-assoċjazzjoni multivalenti tikkostitwixxi l-evidenza meħtieġa li l-annimal ittestjat huwa dak li jġorr it-traslokazzjoni.

Jekk l-ebda selezzjoni ta' tgħammir ma tkun saret l-irġiel F1 kollha huma spezzjonati ċitoġenetikament. Il-minimu ta' 25 ċellola tal-metafaži dijakineżi I għal kull raġel għandu jkun milħuq mikroskopikament. L-eżaminazzjoni tal-metafaži mitotika, fl-ispermatogonia jew l-għadma tal-mudullun, hija meħtieġa fl-irġiel F1 bit-testikoli żgħar u t-tnaqqis mejotiku qabel id-dijakineżi jew mis-sospetti tan-nisa F1. Il-presenza ta' kromożoma twila u/jew qasira b'mod abnormali f'kull waħda mill-10 ċelloli hija evidenza għat-traslokazzjoni partikolari ta' l-irġiel sterili (tip c-t). Xi ftit traslokazzjonijiet X-awtosomatiċi li jikkawżaw l-isterilità fl-irġiel jistgħu biss ikunu identifikati bl-analiżi tal-gruppi tal-kromożomi mitotiċi. Il-presenza ta' 39 kromożomi fl-10 mitoži kollha hija evidenza għall-kondizzjoni XO f'mara.

2. **ID-DATA**

Id-data hija preżentata fil-forma ta' tabelli.

Il-medja tad-daqs tal-boton u r-rata tas-sess mit-tagħmir tal-ġenituri fit-twelid u l- l-ftiem huma rappurtati għal kull intervall ta' tgħammir.

Għall-assessjar tal-fertilità ta' l-annimali F1, il-medja tad-daqs tal-boton ta' tgħammiriet kollha normali u d-daqsijiet tal-botnijiet individwali ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni F1 huma preżentati. Għall-analiżi tal-kontenut ta' l-utru, il-medja tan-numru ta' l-impjanti ħajjin u mejtin ta' tgħammiriet normali u n-numri individwali ta' l-impjanti ħajjin u mejtin għal kull tgħammira ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni F1 huma rappurtati.

Għall-analiżi ċitoġenetika tal-metafaži-dijakineżi I, in-numri tat-tipi tal-konfigurazzjonijiet multivalenti u n-numru totali taċ-ċelloli huma mniżżla għal kull wieħed li jġorr it-traslokazzjoni.

Għall-individwi F1 sterili, in-numru totali tat-tgħammiriet u t-tul tal-perjodu tat-tgħammir huma rappurtati. Il-piż tat-testikoli u d-dettalji ta' l-analiżi ċitoġenetika huma mogħtija.

Għan-nisa XO, il-medja tad-daqs tal-boton, ir-rata tas-sess ta' l-ulied F2 u r-riżultati ta' l-analiżi ċitoġenetika huma rappurtati.

Fejn ikunu possibli dawk li jġorru t-traslokazzjoni F1 huma magħżula minn qabel bit-testijiet tal-fertilità, it-tabelli għandhom jinkludi l-informazzjoni fuq kemm minn dawn kienu konfermati eterożigoti tat-traslokazzjoni.

Id-data mill-kontrolli negattivi u l-esperimenti pożittivi tal-kontroll huma rappurtati.

3. **IR-RAPPURTAR**

3.1 **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandhu, jekk possibbli, jkun fih l-informazzjoni li ġejja:

— ir-razza tal-ġrieden, iż-żmien ta' l-annimali, il-piż ta' l-annimali trattati,

— in-numri ta' l-annimali ġenituri ta' kull sess fil-gruppi esperimentali jew kontrollati,

— il-kondizzjonijiet ta' l-ittestjar, id-deskrizzjoni dettaljata tat-trattament, il-livelli tad-doża, is-solventi, iċ-ċedola tat-tgħammir,

— in-numru u s-sess ta' l-ulied għal kull mara, in-numru u s-sess ta' l-ulied miżjud għall-analiżi tat-traslokazzjoni,

— il-ħin u l-kriterji għall-analiżi tat-traslokazzjoni,

— in-numru u d-deskrizzjoni dettaljata ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni, inkluża d-data tat-tgħammir u d-data tal-kontenut ta' l-utru, jekk applikabbli,

— il-proċeduri ċitoġeneticI u d-detallji ta' l-analiżi mikroskopika, preferibbilment bl-istampi,

— il-valutazzjoni statistika,

— id-diskussjoni tar-riżultati,

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2 **Il-valutazzjoni u l-interpretazzjoni**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **IR-REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

PARTI C: IL-METODI GĦAD-DETERMINAZZJONI TA' L-EKOTOXIĊITÀ

L-INTRODUZZJONI ĠENERALI: PARTI C

Il-metodi ta' l-ittestjar deskritti hawn taħt huma għad-determinazzjoni ta' ċerti proprjetajiet ekotoxikoloġiċi mniżżla fl-Anness VIII tad-Direttiva 79/831/KEE. Dawk li javżaw għandhom ikunu konxji li l-metodi għad-determinazzjoni tal-proprjetajiet li ġejjin li kienu diġa' magħrufa fl-Anness VIII mhumiex inklużi fit-test:

— L-istudju mtawwal tat-toxiċità *Dapnia magna*,

— It-test fuq pjanta aktar għolja,

— L-istudju mtawwal tat-toxiċità bil-ħut,

— It-test għall-akkumulazzjoni ta' l-ispeċi.

Meta' l-metodi adattati għat-testijiet għad-determinazzjoni ta' dawn il-proprjetajiet huma finalizzati għandhom ikunu ppubblikati fil-forma ta' adattament aktar għall-progress tekniku. Fl-interim, dawk li javżaw għandhom jużaw metodi adattati, magħrufa internazzjonalment li għandhom ikunu identifikati lill-awtorità kompetenti.

IT-TEST TA' L-INIBIZZJONI TA' L-ALKA

1. IL-METODU

1.1 L-Introduzzjoni

Ir-raġuni ta' dan it-test huwa biex ikunu determinati l-effetti tas-sostanza fuq it-tkabbir ta' l-ispeċi ta' l-alka ħadra uniċellulari. Testijiet relattivament qosra jistgħu jistmaw l-effetti fuq bosta ġenerazzjonijiet. Dan il-metodu jista' adattat għall-użu ma' bosta speċi ta' l-alga uniċellulari, f'liema każ deskrizzjoni tal-metodu użat għandu jkun provdut mar-rapport tat-test.

Dan il-metodu huwa applikat bl-aktar mod faċli għas-sostanzi li jinħallu fl-ilma li, taħt il-kondizzjonijiet tat-test, probabbilment jibqgħu fl-ilma.

Għas-sostanzi b'solubilità limitata fil-mezz tat-test, jista' ma jkunx possibbli li jkun determinat l-EC50 b'mod kwantitattiv (ara Definizzjonijiet, taħt).

Il-metodu jista' jkun użat għas-sostanzi li ma jinterferux direttament mal-qies tal-kobor ta' l-alga.

L-informazzjoni li ġejja tista' tkun utli meta' jkun qed isir dan it-test:

— Is-solubilità ta' l-ilma,

— Il-pressjoni tal-fwar,

— Il-formula strutturali,

— Il-purità tas-sostanza,

— L-istabbilità kimika fl-ilma u fid-dawl,

— Il-metodi ta' l-analiżi għall-kwantifikazzjoni tas-sostanza fl-ilma,

— Il-valur pK2,

— Il-koeffiċjent tal-qsim ta' l-n-Octanol/ilma,

— Ir-riżultati tat-test lest tal-bijodegradabilità.

1.2 Id-definizzjonijiet u l-unitajiet

Il-konċentrazzjoni taċ-ċelloli: in-numru taċ-ċelloli għal kull millimetru;

Il-kobor: iż-żieda fil-konċentrazzjoni taċ-ċelloli matul il-perjodu tat-test;

Ir-rata tal-kobor: iż-żieda fil-konċentrazzjoni taċ-ċellola għal kull unità t' ħin;

EC50: f'dan il-metodu, dik il-konċentrazzjoni tas-sostanza tat-test li tirriżulta f'50% tnaqqis jew fil-kobor jew fir-rata tal-kobor għall-kontroll;

NOEC (l-ebda effett fuq il-konċentrazzjoni ma kienet osservata): f'dan il-metodu, il-konċentrazzjoni l-aktar għolja li kienet ittestjata li fiha l-parametru(i) mkejla turi l-ebda inibizzjoni sinifikanti tal-kobor relattiv għall-valuri tal-kontroll.

1.3 Is-sostanzi tar-referenza

Is-sostanza tar-referenza tista' tkun ittestjata bħala mezz biex ikunu skoperti kondizzjonijiet ta' l-ittestjar li mhumiex sodisfaċenti. Jekk sostanza tar-referenza hija wżata, ir-rizultati għandhom ikunu mogħtija fir-rapport tat-test. Il-potassju dikromatiku jista' jkun użat bħala sostanza tar-referenza.

1.4 Il-prinċipju tal-metodu tat-test

Il-kulturi li jikbru b'mod esponenzali ta' l-alga ħadra magħżula huma esposti għal konċentrazzjonijiet varji tas-sostanza tat-test fuq bosta ġenerazzjonijiet taħt kondizzjonijiet definiti. L-inibizzjoni tal-kobor in relazzjoni għal kultura kontrollata hija determinata fuq perjodu fiss.

1.5 **Il-kriterji tal-kwalità**

1.5.1 *Il-kondizzjonijiet għall-validità tat-test*

Il-konċentrazzjoni taċ-ċelloli fil-kulturi kontrollati għandhom jiżdiedu b'fattur ta' mill-anqas 16 fi żmien tlett ijiem.

In-nuqqas tas-sostanza tat-test mill-ilma fil-massa bijoloġika mhux neċessarjament tinvalida t-test.

1.6 **Id-deskrizzjoni tal-proċedura tat-test**

1.6.1 *Il-preparazzjoni*

1.6.1.1 It-tagħmir u l-materjali

— It-tagħmir normali tal-laboratorju,

— Il-flixken tat-testijiet ta' volum adattat (eż. flixken tondi ta' 250ml huma adattati meta' l-volum tas-soluzzjoni tat-test hija 100ml),

— L-apparat għall-kulturi: armarju jew kamra li fiha t-temperatura fil-limiti ta' 21 sa 25 +/- 2C tista' tkun miżmuma, u illuminazzjoni kontinwa u uniformi għandha tkun provvduta fil-limiti ta' 400 sa 700 nm. (Il-*quantum flux* ta' 0,72 * 1020 *photons/m2s* ġo +/- 20% huwa rakkomandat. Dan il-*quantum flux* jekwivali għal 120 mE/m2s u jista' jkun miksub b'lampi universali florexxenti tat-tip bojod (temperatura ħafifa ta' bejn wieħed u ieħor 4 200 K) li tagħti bejn wieħed u ieħor 8 000 *lux* imkejjla b'kollettur sferiku.)

— biex ikunu determinati l-konċentrazzjonijiet taċ-ċelloli, eż. dak li jgħodd il-partiċelli elettroniċi, il-mikroskopju bil-parti li tgħodd, il-*flourimeter*, l-ispektrofotometru, il-kolorimetru (Nota: biex ikunu provduti qisien tajbin f'konċentrazzjonijiet baxxi taċ-ċelloli meta' jkun qiegħed jiġi użat spektrofotometru, jista' jkun neċessarju li jintużaw *cuvettes* b'medda ta' dawl ta' mill-anqas 4 cm).

1.6.1.2 Il-mezz ta' l-alka

Il-mezz li ġej huwa rakkomandat:

NH_4Cl:	15	mg/l,
$MgC1_2.6H_2O$:	12	mg/l,
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l,
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l,
KH_2PO_4:	1,6	mg/l,
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l,
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l,
H_3BO_3	0,185	mg/1,
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l,
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l,
$CoCl_2.6H_2O$:	$1,5\times10^{-3}$	mg/l,
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l,
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l,
$NaHCO_3$:	50	mg/l.

Il-pH ta' dan il-mezz wara l-ekwilibrazzjoni ma' l-arja huwa aprossivament 8.

L-użu ta' mezzi oħra mhuwiex preklużmir-rakkomandazzjoni ta' hawn fuq sakemm madanakollu, li l-limiti li ġejjin tal-kostitwenti essenzali huma rispettati:

P:	≤ 0,7 mg/l,
N:	≤ 10 mg/l.
chelators:	≤ 10^{-3} mmol/l
ebusija (Ca + Mg):	≤ 0,6 mmol/l

Il-mezz rakkomandat u l-mezz mogħti fir-referenza (1) jikseb din il-ħtieġa.

1.6.1.3 Organiżmi ta' l-esperimenti

L-Għażla ta' l-ispeċi

Huwa suġġerit li l-ispeċi ta' l-alka ħadra li tkun użata tkun speċi li tikber malajr li hija konvenjenti biex tkun ikkultivata u ttestjata. L-ispeċi li ġejjin huma konsidrati adattati:

— Selenastrum capricornutum ATCC 22662,

— Scenedesmus subspicatus 86.81 SAG,

— Chlorella vulgaris CCAP 211/11b.

Jekk speċi oħra jkunu użati, ir-razza għandha tkun rappurtata.

1.6.1.4 Id-disinn tat-test

Il-konċentrazzjoni inizjali taċ-ċelloli

Huwa rakkomandat li l-konċentrazzjoni inizjali taċ-ċelloli fil-kulturi tat-test tkun approssivament 10 4 ċelloli/ml għas-*Selenastrum capricornutum* u s-*Scenedesmus subspicatus*.

Il-konċentrazzjonijiet tas-sostanzi tat-test

Il-limiti tal-konċentrazzjoni li fihom l-effetti probabbilment jidhru huma determinati fuq il-bażi tar-riżultati mit-testijiet li jsibu l-limiti. Għat-test, minn ta' l-anqas ħames konċentrazzjonijiet irranġati f'serje ġeometrika għandhom ikunu magħżula. Il-konċentrazzjoniji ttestjata l-akta baxxa m'għandhu jkollha l-ebda effetti osservati fuq il-kobor ta' l-alga. L-għola konċentrazzjoni ttestjata għandha twaqqaf il-kobor b'minn ta' l-anqas 50% relattiv mal-kontroll u, preferibbilment, twaqqaf il-kobor kompletament.

Ir-repliki u l-kontrolli

Id-disinn tat-test għandu jinkludi preferibilment tlett repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test u idealment id-doppju ta' dak in-numru tal-kontrolli. Jekk ġustifikat, id-disinn tat-test jista' jkun alterat biex jiżdied in-numru tal-konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru tar-repliki għal kull konċentrazzjoni.

Meta' l-vettura hija wżata biex ikunu maħlula l-kontrolli tas-sostanzi addizzjonali tat-test li fihom il-vettura fil-konċentrazzjonijiet wżati l-aktar għolja fil-kulturi tat-test għandhom ikunu inklużi fid-disinn tat-test.

1.6.2. *Performance of the test*

This section contains guidance for the testing of readily soluble and poorly soluble substances and of volatile substances.

1.6.2.1 L-ittestjar tas-sostanzi li jinħallu malajr fl-ilma

Il-kulturi tat-testijiet li fihom il-konċentrazzjonijiet tas-sostanza tat-test li jkunu mixtieqa u l-kwantità mixtieqa ta' l-alka użata għat-tilqim huma preparati billi jitħalltu mal-mezz ta' l-alka iffiltrat, l-alikwoti tas-soluzzjonijiet ta' l-istokk tas-sostanza tat-test u tas-sospensjoni ta' l-alka.

Il-flixken tal-kulturi jiġu mħawwda u mpoġġija fl-apparat tal-kulturi. Waqt it-test huwa neċessaraju li l-alka tinżamm in sospensjoni u biex tkun faċilitata il-mogħdija tac-CO2. Għal dan il-għand it-taħwid, it-tidwir u l-għoti ta' l-arja jistgħu jiġu wżati. Il-kulturi għandhom ikunu miżmuma f'temperatura fil-limiti ta' 21 sa 25 C, kontrollati fi +/- 2 C.

Il-konċentrazzjoni taċ-ċelloli f'kull flixkun hija determinata minn ta' l-anqas, 24, 48 u 72 siegħa wara l-bidu tat-test. Il-mezz ta' l-alka ffiltrata huwa wżat biex ikun determinat l-isfond meta' jkunu qegħdin jiġu wżati dawk li jgħoddu l-partiċelli jew bħala vojt meta' jkunu qegħdin jintużaw l-ispektrofotometri.

Il-pH huwa mkejjel fil-bidu tat-test u fit-72 siegħa.

Il-pH tas-soluzzjonijiet m'għandux normalment jiddevja b'aktar minn unit wieħed matul it-test.

1.6.2.2 Is-sostanza ta' l-ittestjar b'solubilità limitata fl-ilma

Meta' s-solubilità tas-sostanza tat-test huwa ta' l-ordni tal-konċentrazzjoni l-aktar għolja wżata fit-test, devjazzjonijiet żgħar biss mill-proċedura t'hawn fuq huma neċessarji biex ikunu magħmulin is-soluzzjonijiet tat-test. Is-soluzzjoni saturata tista' sservi bħala s-soluzzjonijiet ta' l-istokk tas-sostanza tat-test. L-approċċ l-ieħor jista' jkun li tinħall is-sostanza tat-test fil-konċentrazzjoni mixtieqa fil-mezz ta' l-alka qabel l-introduzzjoni tas-sospensjoni ta' l-alka.

Is-soluzzjonijiet tas-sostanzi ta' l-istokk ta' solubilità baxxa fl-ilma jistgħu jkunu preparati b'tifrix mekkaniku jew bl-użu tal-vetturi tat-toxiċità baxxa għall-alka, bħal ma huma s-solventi organiċi, l-emulsjonanti jew is-sostanzi li jxerrdu. Meta' vettura tiġi wżata il-konċentrazzjoni m'għandix taqbeż l-100mg/litru, u l-kontrolli addizzjonali, li qegħda inkorporata fihom il-vettura fil-konċentrazzjoni preżenti l-aktar għolja fis-soluzzjonijiet tat-test, għandha tkun inkluża fid-disinn tat-test.

1.6.2.3 L-ittestjar tas-sostanzi volatili

Sa llum m'hemm l-ebda mod ġeneralment aċċettat biex ikunu ttestjati s-sotanzi volatili. Meta' jkun magħruf li sostanza għandha tendenza li tevapora, flixken tat-testijiet magħluqin bi spazju miżjud fuq għandhom jintużaw. Il-varjazzjonijiet għal dan il-metodu ġew proposti (ara r-referenza (1)).

Għandhom isiru l-provi biex ikun determinat l-ammont tas-sostanza li tibqa fis-soluzzjoni, u attenzjoni estrema għandha tintuża meta' jkunu qegħdin jiġu interpretati r-riżultati tat-test bil-kimiċi volatili meta' jkunu qegħdin jintużaw sistemi magħluqa.

2. **ID-DATA U L-INFORMAZZJONI**

Il-konċentrazzjonijiet taċ-ċelloli mkejjla fil-kulturi tat-test u l-kontrolli għandhom ikunu magħmula f'tabella flimkien mal-konċentrazzjonijiet tas-sostanzi tat-test u l-ħinijiet tal-qisien. Il-valur medju tal-konċentrazzjonijiet taċ-ċelloli għal kull konċentrazzjoni tas-sostanza tat-test u għall-kontrolli hija mpinġija kontra l-ħin biex tipproduċi il-kurvi tat-tkabbir.

Biex tkun determinata ir-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett, iż-żewġ approċċi li ġejjin għandhom ikunu wżati.

2.1. **Il-paragun taż-żoni ta' taħt il-kurvi tat-tkabbir**

Iż-żona ta' taħt il-kurvi tat-tkabbir tista' tkun ikkalkulata skond il-formula:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

fejn:

A = żona,

N_0 = in-numru nominali taċ-ċelloli/ml fil-ħin t_0,

N_t = in-numru taċ-ċelloli mkejjel/ml fi t_1,

N_n = in-numru taċ-ċelloli mkejjel/ml fil-ħin t_n,

t_1 = il-ħin ta' l-ewwel qies wara l-bidu tat-test,

t_n = il-ħin tal-qies ta' l-n_{th} wara l-bidu tat-test.

Il-persentaġġ ta' l-inibizzjoni tal-kobor taċ-ċelloli f'kull konċentrazzjoni tas-sostanza tat-test (I_A) hija kkalkulata bħala d-differenza bejn iż-żona taħt il-kontroll tal-kurva tal-kobor (A_c) u ż-żona taħt il-kurva tal-kobor f'kull konċentrazzjoni tas-sostanza tat-test (A_t) bħala:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Il-valuri IA huma mpinġija fuq karta semilogaritmika jew karta semilogaritmika ta' l-unità tal-probbabilità bbażata fuq id-devjazzjoni mill-medja ta' distribuzzjoni *standard,* kontra l-konċentrazzjonijiet korrispondenti. Jekk ikunu mpinġija fuq il-karta ta' l-unità tal-probbabilità bbażata fuq id-devjazzjoni mill-medja ta' distribuzzjoni *standard*, il-punti ikunu mpoġġija fuq linja dritta bil-għajn, jew, meta' tkun tista' bħala probabbli d-distribjuzzjoni tal-*log* normali, il-linja tar-rigressjoni maħduma tista' tkun impinġija.

Il-valur ta'l-EC50 jirriżulta minn dik il-parti tal-linja bejn żewġ punti ta' intersezzjoni ma' linja oħra tal-linja tar-rigressjoni ma' dik parallela impinġija ma' l-axxiża fil-IA = 50%. Biex ikun imniżżel dan il-valur b'mod li mhux ambigwu in relazzjoni ma' dan il-metodu ta' kalkolazzjoni huwa propost li jkun użat is-simbolu EbC50. In relazzjoni ma' dan il-metodu li jispeċifika il-qisien fil-24, 28 u 72 siegħa, is-simbolu jsir EbC50 (0-72h).

Il-valuri EC l-oħrajn, bħal ma huma EbC10, jistgħu wkoll ikunu miksuba mit-tpinġija ta' IA *versus* il-konċetrazzjoni tal-*log*.

2.2 **Il-paragun tar-rati tal-kobor**

Il-medja tar-rata speċifika tal-kobor (m) għall-kulturi li jikbru b'mod esponenzali tista' tkun ikkalkulata bħala

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

B'mod alternattiv, il-medja tar-rata speċifika tal-kobor tista' tkun miksuba mid-dawra tal-linja tar-rigressjoni fit-tpinġija ta' 1n N *versus* il-ħin.

Il-persentaġġ tat-tnaqqis tal-medja tar-rata speċifika tal-kobor f'kull konċentrazzjoni tas-sostanza tat-test meta' kkumparat mal-valur tal-kontroll għandu jkun impinġi kontra l-logaritmu tal-konċetrazzjoni. L-EC50 tagħhom jista' jinqara mill-graff li tirriżulta. Biex l-EC50 miksub b'ad il-metodu jkun imniżżel b'mod li mhux ambigwu huwa propost li jintuża s-simbolu ErC50. Il-ħinijiet tal-qisien għandhom ikunu indikati, eż: jekk il-valur għandu x'jaqsam ma' l-osservazzjoni tal-ħinijiet 24 u 48 siegħat, is-simbolu jsir ErC50 (24-48h).

Nota: ir-rata tal-kobor speċifika huwa terminu tal-logaritmu, u bidliet żgħar fir-rata tal-kobor jistgħu iwasslu għal bidliet kbar fil-massa bijoloġika. Il-valuri ta' l-EbC u ErC huma għalhekk mhux komparabbli b'mod numeriku.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

Ir-rapport tat-test, jekk ikun possibbli, għandu jkun fih l-informazzjoni li ġejja:

— Is-sostanza tat-test: id-data ta' l-identifikazzjoni kimika,

— L-organiżmi tat-test: l-oriġini, il-kultura tal-laboratorju, in-numru tar-razza, il-metodu ta' kultivazzjoni,

— Il-kondizzjonijiet tat-test:

  — id-data tal-bidu u l-aħħar tat-test u t-tul tiegħu,

  — it-temperatura,

  — il-komposizzjoni tal-mezz,

— l-apparat tal-kulturi,
— il-pH tas-soluzzjonijiet fil-bidu u fl-aħħar tat-test (l-ispjegazzjoni għandha tkun mogħtija jekk id-devjazzjonijiet tal-pH ta' aktar minn unit wieħed huma osservati),
— il-vettura u l-metodu użati biex tkun maħlula s-sostanza tat-test u l-konċentrazzjoni tal-vettura fis-soluzzjonijiet tat-test,
— l-intensità u l-kwalità tad-dawl,
— il-konċentrazzjonijiet ittestjati (imkejjla jew nominali).

— Ir-riżultati:
— il-konċentrazzjoni taċ-ċelloli għal kull flixkun f'kull punt tal-kejl u l-metodu biex tkun imkejjla l-konċentrazzjoni taċ-ċelloli,
— il-valuri medji tal-konċentrazzjonijiet taċ-ċelloli,
— il-kurvi tat-tkabbir,
— il-preżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett,
— il-valuri EC u l-metodi tal-kalkulazzjoni,
— NOEC,
— l-effetti l-oħra osservati.

4. **IR-REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, *Test Guideline 201*, id-Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 Finali.
(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag 'Hemmung der Zellvermehrung bei der Grunalge *Scevedesmus subspicatus*', fi: Rudolph/Boje: *Okotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Appendiċi

EŻEMPJU TA' PROĊEDURA GĦALL-KULTURA TA' L-ALKA

Osservazzjonijiet Ġenerali

Ir-raġuni għall-kultura fuq il-bażi tal-proċedura li ġejja hija li jinkisbu kulturi ta' l-alka għat-testijiet tat-toxiċità.

Il-metodi xierqa għandhom ikunu wżati biex ikun żgurat li l-kulturi ta' l-alka ma jkunux infettati bil-batterji (ISO 4833). Il-kulturi *axenic* jistgħu ikunu mixtieqa iżda il-kulturi ta' l-unialka huma essenzali.

L-operazzjonijiet kollha jistgħu jkunu magħmula taħt il-kondizzjonjiet sterili biex b'hekk tkun evitata l-kontaminazzjoni mal-batterji u l-alka l-oħra.

It-tagħmir u l-materjali

Ara taħt 1.6.1: Il-preparazzjonijiet u l-organiżmi sperimentali.

Il-proċeduri biex jinkisbu l-kulturi ta' l-alka

Il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet nutrijenti (mezz)

Il-melħ kollha nutrijenti tal-mezz ikun preparat bħala soluzzjonijiet ta' l-istokk konċentrat fid-dlam u l-bard. Dawn is-soluzzjonijiet huma sterilizzati bil-filtrazzjoni jew bl-awtoklavi.

Il-mezz jiġi preparat billi jiżdiedu miegħu l-ammonti korretti tas-soluzzjonijiet ta' l-istokk ma' l-ilma sterili distillat, u billi tieħu ħsieb li l-ebda infezzjonijiet ma jirriżultaw. Għall-mezz solidu 0,8% ta' l-agar huwa miżjud.

Il-kultura ta' l-istokk

Il-kulturi ta' l-istokk huma kulturi żgħar ta' l-alka li huma trasferiti regolarment għall-mezz frisk biex jintużaw bħala materjal inizjali għat-testijiet. Jekk il-kulturi ma jkunux użati regolarment dawn jiġu mifruxa fi strixxi fuq it-tubi mgħawwġa ta' l-agar. Dawn ikunu trasferiti għall-mezz frisk minn ta' l-anqas darba kull xahrejn.

Il-kulturi ta' l-istokk jiġu mkabbra fil-flixken tondi li jkun fihom il-mezz xieraq (il-volum ta' madwar 100ml). Meta' l-alka tkun inkubata f'20C bl-illuminazzjoni kontinwa, trasferiment kull gimgħa huwa meħtieġ.

Waqt it-trasferiment ammont ta' kultura 'qadima' hija trasferita bil-pipetti sterili fi flixkun bil-mezz frisk, biex b'hekk bl-ispeċi li tikber malajr il-konċentrazzjoni inizjali hija ta' madwar 100 darba aktar żgħir milli fil-kultura l-qadima.

Ir-rata tat-tkabbir ta' l-ispeċi tista' tkun determinata mill-kurva tal-kobor. Jekk din tkun magħrufa, ikun possibli li tistima id-densità li fiha l-kultura għandha tkun trasferita għall-mezz gdid. Dan għandu jkun magħmul qabel ma' l-kultura tilħaq il-fażi tal-mewt.

Il-kultura ta' qabel

Il-kultura ta' qabel hija maħsuba biex tagħti ammont ta' alka adattata għat-tilqim tal-kulturi tat-test. Il-kultura ta' qabel hija inkubata taħt il-kondizzjonijet tat-test u wżata meta' tkun għada qiegħda tikber b'mod esponenzali, normalment wara l-perjodu ta' l-inkubazzjoni ta' madwar tlett ijiem. Meta' l-kulturi ta' l-alka jkun fihom ċelloli deformati jew abnormali, dawn għandhom ikunu mormija.

IT-TOXIĊITÀ TAL-ĦNIEX

IT-TEST TAL-ĦAMRIJA ARTIFIĊJALI

1. **IL-METODU**

1.1 **L-introduzzjoni**

F'dan it-test tal-laboratorju, is-sostanza tat-test hija miżjuda mal-ħamrija artifiċjali li l-ħniex ikunu mpoġġija fiha għal 14-il ġurnata. Wara dan il-perjodu (u b'għażla wara seba' t'ijiem) l-effett letali tas-sostanza fuq il-ħniex hija eżaminata. It-test jipprovdi metodu għal superviżjoni relativvament għall-perjodu qasir ta' l-effett tal-kimiċi fuq il-ħniex, bit-teħid tal-ġilda jew alimentari.

1.2 **Id-definizzjoni u l-unità**

LC50: Il-konċentrazzjoni tas-sostanza stmata bħala li toqtol 50% ta' l-annimali ttestjati waqt il-perjodu tat-test.

1.3 **Is-sostanza tar-referenza**

Is-sostanza tar-referenza hija wżata perjodikament bħala mezz ta' dimostrazzjoni li s-sensitività tas-sistema tat-test ma nbidlitx b'mod sinifikattiv.

Il-*chloroacetamide* analitiku tal-grad huwa rakkomandat bħala s-sostanza referenza.

1.4 **Il-prinċipju tat-test**

Il-ħamrija hija mezz varjabbli, u għalhekk għal dan it-test il-ħamrija artifiċjali tal-lom definita hija wżata. Il-ħniex adulti ta' l-ispeċi *Eisenia foetida* (ara n-nota fl-Appendiċi) huma miżmuma f'ħamrija artifiċjali definita trattata b'konċentrazzjonijiet differenti tas-sostanzi tat-test. Il-kontenut tal-kontenituri huwa mifrux fuq gabarre 14-il ġurnata (u b'għażla seba' t'ijiem) wara l-bidu tat-test, u l-ħniex li jibqgħu ħajjin f'kull konċentrazzjoni jkunu magħduda.

1.5 **Il-kriterji tal-kwalità**

It-test huwa disinnjat biex ikun riproduċibbli kemm jista' jkun fir-rigward tas-substrat u l-organiżmu tat-test. Il-mortalità fil-kontrolli m'għandhix taqbeż l-10% fl-aħħar tat-test, jew inkella it-test ikun invalidu.

1.6 **Id-deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

1.6.1 *Il-materjali*

1.6.1.1 Is-substrata tat-test

Il-ħamrija artifiċjali definita hija wżata bħala substrat bażiku għat-test.

(a) Is-substrata bażika (il-persentaġġi huma fit-termini tal-piż niexef)

— 10% pit *Sphagnum* (kemm jista' jkun l-aktar qrib għall-pH 5,5 sa 6,0 bl-ebda fdalijiet tal-pjanti li jidhru u miħun fin),

— 20% tafal tal-kawlina bi preferibbilment aktar minn 50% kawlina,

— Madwar 69% ramel tal-kwarz industrijali (ramel fin dominanti b'aktar minn 50% tal-qies tal-partiċelli ta' 0,05 sa 0,2mm). Jekk is-sostanza m'hijiex suffiċjentament abbli li tinfirex fl-ilma, 10g għal kull kontenitur tat-test għandhom jinżammu disponibbli biex jitħalltu mas-sostanza tat-test aktar tard,

— Madwar 1% karbonat tal-kalċju (CaCO3), fi trab, kimikament pur, miżjud biex il-pH jinġieb sa 6,0 +/- 0,5.

(b) Is-substrata tat-test

Is-substrata tat-test ikun fiha is-substrata bażika, is-sostanza tat-test u l-ilma detonizzat.

Il-kontenut ta' l-ilma huwa ta' madwar 25 sa 42% tal-piż niexef tas-substrata bażika. Il-kontenut ta' l-ilma tas-substrata huwa determinat billi jkun imnixxef kampjun għall-piż kostanti ta' 105 C. Il-kriterju prinċipali huwa li l-ħamrija artifiċjali għandha tkun imxarrba sal-punt fejn m'hemm l-ebda ilma qiegħed. Għandu jkun hemm attenzjoni meta' jkun qed isir it-taħlit biex tkun miksuba distribuzzjoni ugwali tas-sostanza tat-test u tas-substrata. Il-mod ta' kif tkun introdotta is-sostanza tat-test mas-substarata għandu jkun rappurtat.

(c) Is-substrata tal-kontroll

Is-substrata tal-kontoll fiha is-substrata bażika u l-ilma. Jekk aġent adittiv ikun użat, il-kontroll addizzjonali għandu jkun fih l-istess kwantità ta' l-aġent addittiv.

1.6.1.2 Il-kontenituri ta' l-ittestjar

Il-kontenituri tal-ħġieġ ta' madwar litru kapaċità (adegwatament miksija bl-għatien tal-plastik, id-dixxijiet jew l-film tal-plastic bit-toqob għall-ventilazzjoni) mimlija b'ammont tas-substrata mxarrba tat-test jew tal-kontroll ekwivalenti għall-500g tal-piż niexef tas-substrata.

1.6.2 *Il-kondizzjonijiet tat-test*

Il-kontenituri għandhom jinżammu fi kmamar klimatiċi f'temperatura ta' 20 +/-2C bid-dawl kontinwu. L-intensità tad-dawl għandha tkun ta' 400 sa 800 *lux*.

Il-perjodu tat-test huwa ta' 14-il ġurnata, iżda l-mortalità tista' tkun stmata b'għażla ta' seba' t'ijiem wara li jibda t-test

1.6.3 *Il-proċedura tat-test*

Il-konċentrazzjonijiet tat-test

Il-konċentrazzjonijiet tas-sostanza tat-test huma espresse bħala piż tas-sostanza għall-piż niexef tas-substrata bażika (mg/kg).

It-test biex jinstabu l-limiti

Il-limiti tal-konċentrazzjonijiet li jikkawża mortalità ta' 0 sa 100% biss jistgħu jkunu determinati f'test biex jinstabu l-limiti biex tkun provvduta l-informazzjoni fuq il-limiti tal-konċentrazzjonijiet li għandhom jintużaw fit-test definittiv.

Is-sostanza għandha tkun ittestjata fil-konċentrazzjonijiet li ġejjin: 1 000; 100; 10; 1; 0,1mg tas-sostanza/kilogramma tas-substrata tat-test (il-piż niexef).

Jekk it-test sħiħ definittiv għandu jkun magħmul, grupp wieħed għal kull konċentrazzjoni u wieħed għall-kontroll mhux trattat, kull wieħed b'għaxar ħniex, għandu jkun suffiċjenti għat-test biex jinstabu l-limiti.

It-test definittiv

Ir-riżultati għat-test biex jinstabu l-limiti huma wżati biex jintgħażlu minn ta' l-anqas ħames konċentrazzjonijiet f'serje ġeometrika li tilħaq eżatt il-limiti ta' bejn 0 sa 100% tal-mortalità u li tinbidel b'fattur kostanti li ma jaqbiżx il-1,8.

It-testijiet li jużaw din is-serje ta' konċentrazzjoni għandhom iħallu l-valur LC50 u l-limiti tiegħu ta' kunfidenza biex ikunu stmati kemm jista' jkun b'mod preċiż.

Fit-test definittiv minn ta' l-anqas erba' gruppi tat-testijiet għal kull konċentrazzjoni u erba' kontrolli mhux trattati, kull wieħed b'10 ħniex, huma wżati. Ir-riżultati ta' dawn il-gruppi repliki huma mogħtija bħala devjazzjoni medja u *standard*.

Meta' żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi, b'rata ta' 1,8, jagħtu biss 0 u 100% mortalità, dawn iż-żewġ valuri huma suffiċjenti biex jindikaw il-limiti li fihom jaqa' l-LC50.

It-taħlita tas-substrata bażika tat-test u s-sostanza tat-test

Is-substrata tat-test għandha, kull meta' jkun possibbli, tkun magħmula mingħajr ebda aġenti addizzjonali minbarra l-ilma. Immedjatament qabel il-bidu tat-test, l-emulsjoni jew it-tixrid tas-sostanza tat-test f'ilma mingħajr jonji jew f'xi solvent ieħor tiġi mħallta mas-substrata bażika tat-test, jew sprejjat b'mod ugwali fuqha bi sprej fin kromotagrafiku jew ieħor simili.

Jekk ma tkunx tinħall fl-ilma, is-sostanza tat-test tista' tkun maħlula f'volum żgħir kemm jista' jkun ta' solvent organiku adattat (eż. *hexane* (idrokarbon likwidu), aċeton jew kloroform).

Dawk l-aġenti biss li jtiru malajr jistgħu jkunu wżati biex ikunu iħollu, jferrxu jew jemulsifaw is-sostanza tat-test. Is-substrata tat-test għandha tkun ventilata qabel l-użu. L-ammont ta' ilma evaporat għandu jkun sostitwit. Il-kontroll għandu jkollu l-istess kwantità ta' kwalunkwe aġenti addittiv.

Jekk is-sostanza tat-test ma tkunx solubbli, li tista' tinfirex jew li tista' tkun emulsifata fis-solventi organiċI, 10g tat-taħlita tar-ramel mitħun fin tal-kwarz u kwantità tas-sostanza tat-test neċessarja biex titratta 500g piż niexef tal-ħamrija artifiċjali huma mħallta ma 490g tal-piż niexef tas-substrata tat-test.

Għall kull grupp tat-test, ammont tas-substrata tat-test imxarrba ekwivalenti għal 500g piż niexef tiġi mpoġġija f'kull kontenitur tal-ħġieġ u 10 ħniex, li kienu kkondizzjonati għal 24 siegħa f'substrata simili mxarrba u mbagħad maħsula malajr u l-ilma żejjed mixrub fuq karta li tiffiltra qabel l-użu, huma mpoġġija fuq il-wiċċ tas-substrata tat-test.

Il-kontenituri huma mgħottija bl-għatien tal-plastic imtaqqba, bid-dixxijiet jew bil-film biex ikun evitat li s-substrata tinxef u dawn huma miżmumin taħt il-kondizzjonijiet tat-test għal 14-il ġurnata.

L-istimi għandhom ikunu magħmula 14-il-ġurnata (u b'għażla seba' t'ijiem) wara li jkun magħmul it-test. Is-substrata tiġi mifruxa fuq platt magħmul mill-ħġieġ jew ta' l-azzar li ma jissaddadx. Il-ħniex jiġu eżaminati u n-numru tal-ħniex li għexu għandu jkun determinat. Il-ħniex huma kkonsidrati mejta jekk dawn ma jirrispondux għal stimulu ġentili u mekkaniku mat-tarf ta' quddiem.

Meta' l-eżaminazzjoni tkun magħmula fis-seba' ġurnata, il-kontenitur għandu jerġa' jimtela bis-substrata u l-ħniex li għex għandu jkun sostitwit fuq l-istess wiċċ tas-substrata tat-test.

1.6.4 *L-organiżmi tat-test*

L-organiżmi tat-test għandhom ikunu adulti ta' l-*Eisenia foetida* (ara n-nota fl-Appendiċi) (minn ta' l-anqas ta' żmien xahrejn bil-*clitellum*) tal-piż imxarrab ta' 300 sa 600 mg. (Għall-metodu tat-tgħammir ara l-Appendiċi).

2. **ID-DATA**

2.1 **It-trattament u l-valutazzjoni tar-riżultati**

Il-konċentrazzjonijiet tas-sostanza ttestjata huma rappurtati bir-referenza għall-persentaġġi korrispondenti tal-ħniex mejta.

Meta' d-data tkun adegwata il-valur ta' l-LC50 u l-limiti tal-kunfidenza (p = 0,05) għandhom ikunu determinati billi jintużaw il-metodi *standard* (Litchfield u Wilcoxon, 1949, għall-metodu ekwivalenti). L-LC50 għandu jkun mogħti bħala mg tas-sostanza tat-test għal kull kilogramma tas-substrata tat-test (piż niexef).

F'dawk il-każijiet meta' it-tidwira tal-kurva tal-konċentrazzjoni hija wisq wieqfa biex tippermetti l-kalkulazzjoni ta' l-LC50, stima grafika ta' dan il-valur hija suffiċjenti.

Meta' żewġ konċentrazzjonijiet bħala rata ta' 1,8 jagħtu biss 0% u 100% mortalità, iż-żewġ valuri huma suffiċjenti biex jindikaw il-limiti li fihom jaqa' l-LC50.

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1 **Ir-rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test jekk possibbli, għandu, jkun fih dan li ġej:

— id-dikjarazzjoni li t-test kien magħmul skond il-kriterji tal-kwalità msemmija aktar 'il fuq,

— it-test magħmul (it-test li jsib il-limiti u/jew it-test definittiv),

— id-deskrizzjoni eżatta tal-kondizzjonijiet tat-test jew id-dikjarazzjoni li t-test kien magħmul skond il-metodu; kwalunkwe devjazzjonijiet għandhom ikunu rappurtati,

— id-deskrizzjoni eżatta ta' kif is-sostanza tat-test tiġi mħallta mas-subtrata bażika tat-test,

— l-informazzjoni dwar l-organiżmi tat-test (l-ispeċi, iż-żmien, il-medja u l-limiti tal-piż, il-kondizzjonijiet taż-żamma u n-nifs, il-fornitur),

— il-metodu użat għad-determinazzjoni ta' l-LC50,

— ir-riżultati tat-test inkluża d-data kollha wżata,

— id-deskrizzjoni tas-sintomi jew il-bidliet osservati fl-aġir ta' l-organismi tat-test,

— il-mortalità fil-kontrolli,

— l-LC50 jew il-konċentrazzjoni l-aktar għolja ttestjata mingħajr il-mortalità u l-konċetnrazzjoni l-aktar baxxa b'mortalità ta' 100%, 14-il ġurnata (u b'għażla ta' seba' t'ijiem) wara li jkun mibdi t-test,

— it-tpinġija tal-kurva tal-konċentrazzjoni/respons,

— ir-riżultati miksuba bis-sustanza tar-referenza, kemm jekk bl-assoċjazzjoni mat-test preżenti jew mill-eżerċizzji ta' qabel tal-kontroll tal-kwalità.

4. **IR-REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, *Test Guideline* 207, id-Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali.

(2) Edwards, C.A. and Lofty, J.R., 1977, *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, Londra, 331pp.

(3) Bouche, M.B., 1972, *Lombriciens de France, Ècologie et Systèmatique,* Institu National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. *J.Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, p.99.

(5) Il-Kummissjoni tal-Kommunitajiet Ewropej, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Rapport EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag 'Toxiżitatstest am Regenwurm *Eisenia foetidia* in kunstlichem Boden', f': Rudolph/Boje, Okotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

Appendiċi

It-tgħammir u ż-żamma tal-ħniex qabel l-ittestjar

Biex jitgħammru l-annimali, 30 sa 50 ħanex adult, jitpoġġew f'kaxxa tat-tgħammir bis-substrata friska u mneħħija wara 14-il ġurnata. Dawn l-annimali jistgħu jkunu wżati għal gruppi oħra tat-tgħammir. Il-ħniex imfaqqsa mill-fosdqa huma wżati għall-ittestjar meta' jkunu maturi (taħt il-kondizzjonijiet preskritti wara xahrejn jew tlett xhur).

Il-kondizzjonijiet taż-żamma u tat-tgħammir

Il-kamra klimatika:	it-temperatura ta' 20 +/- 2 C preferibilment bid-dawl kontinwu (intensita' ta' 400 sa 800 *lux*).
Il-kaxxa tat-tgħammir:	il-kontenituri baxxi adattati tal-volum ta' 10 sa 20 l.
Is-substrata:	L-*Eisenia foetida* tista' titrabba fl-eskrimenti ta' annimali varji. Huwa rakkomandat li bħala mezz tat-tgħammir tintuża taħlita ta' 50% mill-volum pit u 50% demel tal-baqar jew taż-żwiemel. Il-mezz għandu jkollu valur tal-pH ta' madwar 6 sa 7 (refolat bil-karbonju tal-kalċju) u konduttività tal-jonje baxxa (anqas minn 6 mmhos jew 0,5% konċentrazzjoni tal-melħ).
	Is-substrata għandha tkun niedja iżda mhux imxarrba żżejjed.
	Il-proċeduri l-oħra ta' suċċess jistgħu jkunu wżati minbarra l-metodu mogħti hawn fuq.

Nota: L-*Eisenia foetida* teżisti f'żewġ razez li ċerti tassonomi sseparaw fi speċi (Bouche, 1972). Dawn huma morfoloġikament simili minnbarra waħda, *Eisenia foetida foetida,* li għandha strixxi tipikament transversi jew faxxi fuq is-segmenti u l-oħra, *Eisenia foetida andrei,* li m'għandix dan u għandha kulur aħmar varjegat. Fejn hu possibbli l-*Eisenia foetida andrei* għandha tintuża. L-ispeċi l-oħra jistgħu jkunu wżati jekk il-metodoloġija neċessarja hija disponibbli.

ID-DEGREDAZZJONI BIJOLOĠIKA

IT-TEST TA' WELLENS – ZAHN

1. **IL-METODU**

1.1 **L-introduzzjoni**

Ir-raġuni tal-metodu hija l-valutazzjoni ta' bijodegradabilità potenzali u aħħarija tas-sostanzi li jinħallu fl-ilma, li mhumiex volatili u organiċi meta' dawn ikunu esposti għall-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin ta' mikro-organiżmi f'test statiku.

L-assorbiment fiżiku-kimiku fuq is-solidi sospiżi jista' jsir u dan għandu jittieħed in konsiderazzjoni meta' jkunu qegħdin jiġu interpretati r-riżultati (ara 3.2).

Is-sostanzi li għandhom ikunu studjati huma wżati f'konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu għall-valuri DOC fil-limiti ta' 50 sa 400 mg/litru jew il-valuri COD fil-limiti ta' 100 sa 1 000mg/litru (DOC = il-karbonju organiku maħlul; COD = id-domanda għall-ossiġnu kimiku). Dawn il-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin għandhom il-vantaġġ li huma affidabbli b'mod analitiku. Il-komposti bil-proprjetajiet tossiċI jistgħu itawwlu jew iwaqqfu il-proċess ta' degradazzjoni.

F'dan il-metodu, il-kejl tal-konċentrazzjoni tal-karboju organiku maħlul jew id-domanda għall-ossiġnu kimiku huwa wżat biex jistima il-bijodegradabilità aħħarija tas-sostanza tat-test.

L-użu simultanju tal-metodu speċifiku analitiku jista' jippermetti l-istimar tal-bijodegradazzjoni primarja tas-sostanza (it-tneħħija ta' l-istruttura kimika maġġuri).

Il-metodu huwa applikabbli biss għal dawk is-sostanzi organiċi tat-test li, fil-konċentrazzjoni wżata fit-test:

— huma solubbli fl-ilma taħt il-kondizzjonijiet tat-test,

— għandhom pressjoni tal-fwar insinjifikanti taħt il-kondizzjonijiet tat-test,

— li mhumiex inibitorji għall-batterji,

— li huma mixruba fis-sistema tat-test biss sa' ċertu limitu,

— li mhumiex mitlufa fir-rawha mis-soluzzjoni tat-test.

L-informazzjoni fuq il-proporzjoni relattivi tal-komponenti maġġuri tal-materjal tat-test għandu jkun utli biex ikunu interpretati r-riżultati miksuba, partikolarment f'dawk il-każijiet fejn ir-riżultati huma baxxi jew marġinali.

L-informazzjoni fuq it-toxiċità tas-sostanza għall-mikro-organiżmi hija mixtieqa għall-interpretazzjoni tar-riżultati baxxi u fl-għażla tal-konċentrazzjoni adattati tat-test.

1.2 **Id-definizzjonijiet u l-unitajiet**

L-ammont ta' degradazzjoni miksuba fl-aħħar tat-test hija rappurtata bħala 'Il-bijodegradabilità fiz-Zahn – it-test ta' Wellens':

$$D_T\ (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

fejn:

DT = id-degredazzjoni bijoloġika (%) fil-ħin T,

CA = DOC (jew COD) valuri fit-taħlita tat-test imkejjla tlett sigħat wara l-bidu tat-test (mg/l) (DOC = Il-Karbonju Organiku Maħlul, COD = Id-domanda għall-Ossiġnu Kimiku),

CT = il-valuri DOC jew COD fit-taħlita tat-test fil-ħin tat-teħid tal-kampjun (mg/l),

CB = il-valuri DOC jew COD tal-vojt fil-ħin tat-teħid tal-kampjun (mg/l),

CBA = il-valuri DOC jew COD tal-vojt, mkejjla tlett sigħat wara l-bidu tat-test (mg/l).

Il-limitu tad-degradazzjoni huwa miżjud għall-eqreb persentaġġ sħiħ.

Il-persentaġġ tad-degradazzjoni huwa dikjarat bħala l-persentaġġ DOC (jew COD) ta' tneħħija tas-sostanza ttestjata.

Id-differenza bejn il-valur imkejjel wara tlett sigħat u l-valur inizjali kkalkulat jew preferibbilment imkejjel jista' jipprovdi informazzjoni utli fuq l-eliminazzjoni tas-sostanza (ara 3.2, L-interpretazzjoni tar-riżultati).

1.3 **Is-sostanzi tar-referenza**

F'ċerti każijiet meta' jkunu qegħdin jiġu investigati sostanzi ġodda s-sostanzi tar-referenza jistgħu jkunu utli; madanakollu, s-sostanzi speċifiċI tar-referenza ma jistgħux ikunu rakkomandati.

1.4 **Il-prinċipju tal-metodu tat-test**

It-tajn oħxon attivat, in-nutrijenti minerali u l-materjali ta' l-ittestjar bħala l-unika sors tal-karbonju f'soluzzjoni mimlija ilma huma mpoġġija flimkien f'reċipjent tal-ħġieġ li jieħu minn litru sa erba' litri mgħammar b'aġitatur u b'apparat li jagħti l-arja. It-taħlita tiġi aġitata u mogħtija l-arja f 20 sa 25 C taħt l-illuminazzjoni mferrxa jew f'kamra mudlama sa 28 ġurnata. Il-proċess ta' degradazzjoni jiġi kkontrollat bid-determinazzjoni tal-valuri tad-DOC (jew is-COD) fis-soluzzjoni ffiltrata f'intervalli ta' kuljum jew f'intervalli oħra tal-ħin adattati. Ir-rata tad-DOC (jew COD) eliminati wara kull intervall għall-valur tlett sieġħat wara l-bidu hija espressa bħala persentaġġ ta' bijodegradazzjoni u sservi bħala kejl tal-limitu ta' degradazzjoni f'dan il-ħin. Ir-riżultat ikun impinġi *versus* il-ħin biex jagħti l-kurva tal-bijodegradazzjoni.

Meta' l-metodu speċifiku analitiku jkun użat, it-tibdiliet fil-konċentrazzjoni tal-molekula maġġuri minħabba d-degradazzjoni tista' tkun imkejjla (bijodegradabilità primarja).

1.5 **Il-kriterji tal-kwalità**

Ir-riproduċibilità ta' dan it-test ġie pruvat li ħi sodisfaċenti f'test ċirku.

Is-sensittività tal-metodu hija determinata l-aktar mill-varjabilità tal-vojt u, anqas, mill-preċiżjoni tad-determinazzjoni tal-karbonju organiku maħlul u l-livell tal-kompost tal-likur tat-test.

1.6 **Id-deskrizzjoni tal-proċedura tat-test**

1.6.1 *Il-preparazzjonijiet*

1.6.1.1 Ir-reaġenti

L-ilma tat-test: l-ilma tax-xorb bil-kontenut tal-karbonju organiku < 5mg/litru. Il-konċentrazzjoni tal-jonji tal-kalċju u tal-manjesju flimkien ma jistgħux jaqbżu il-2,7 mmole/litru; jew inkella it-taħlit adegwat ma' l-ilma dejonizzat jew distillat huwa meħtieġ.

L-aċidu sulfuriku, ir-reaġent analitiku (A.R.):	50g/l.
Is-soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju A.R.:	40g/l.
Is-soluzzjoni nutrijenti tal-minerali: ħoll f'litru ilma dejonizzat:	
Il-klorit ta' l-ammonja, NH4, Cl, A.R.:	38,5 g,
Dihydrogenphosphate tas-sodju, NaH2PO4.2H2O, A.R:	33,4 g,
Dihydrogenphosphate tal-potassju, KH2PO4, A.R.:	8,5 g,
di-potassium mono-hydrogenphosphate, K2HPO4, A.R.:	21,75 g.

The mixture serves both as a nutrient and as buffering system.

1.6.1.2 L-apparat

Ir-reċipjenti tal-ħġieġ b'volum ta' litru sa erba' litri (e.ż. ir-reċipjenti ċilindriċi).

L-aġitatur bi strument li jħallat tal-ħġieġ jew tal-metall fuq maqbad adattat (l-istrument li jħallat għandu jdur madwar 5 sa 10 cm fuq il-qiegħ tar-reċipjent). L-istrument li jħallat u li hu manjetiku b' lasta twila minn 7 sa 10 cm tista' tkun użata minflok.

It-tubu tal-ħġieġ ta' 2 sa 4 mm fid-dijametru ta' ġewwa biex tkun introdotta l-arja. Il-ftuħ tat-tubu għandu jkun ta' madwar 1 cm fuq il-qiegħ tar-reċipjent.

¬entrifugu (madwar 3 550g).

Il-metru tal-pH.

Il-metru ta' l-ossiġnu maħlul.

Il-filtri tal-karta.

L-apparat tal-filtrazzjoni tal-membran.

Il-filtri tal-membra, il-qies tal-pora ta' 0,45nm. Il-filtri tal-membran huma adattati jekk huwa żgurat li huma la jerħu l-karbonju u lanqas jassorbu s-sostanza fl-istadju tal-filtrazzjoni.

It-tagħmir analitiku għad-determinazzjoni tal-kontenut tal-karbonju u tad-domanda ta' l-ossiġnu kimiku.

1.6.1.3 Il-preparazzjoni tas-sostanza tat-tilqim

It-tajn oħxon attivat minn pjanta tat-trattament bijoloġiku jiġi maħsul minn (b'mod repettitiv) ċentrifugazzjoni jew tqegħed bl-ilma tat-test (fuq).

It-tajn oħxon attivat għandu jkun f'kondizzjoni adattata. Dan it-tajn huwa disponibbli minn pjanta tat-trattament ta' l-ilma li huwa skart li taħdem tajjeb. Biex jinġabu kemm jista' jkun speċji u razzez differenti ta' batterji, jista' jkun aħjar li titħallat is-sostanza tat-tilqim minn sorsi differenti (e.ż. il-pjanti tat-trattament differenti, l-estratti tal-ħamrija, l-ilma tax-xmara, etc.). It-taħlita għandha tkun trattata kif deskritt hawn fuq.

Biex tkun iċċekkjata l-attività tat-tajn oħxon attivat ara 'Il-kontroll funzjonali', taħt.

1.6.1.4 Il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test

Żied mar-reċipjent tat-test 500ml ta' l-ilma tat-test, 2,5 ml/litru tas-soluzzjoni nutrijenti u t-tajn oħxon attivat f'ammont li jikkorrispondi għal 0,2 sa 1,0g/litru ta' materjal niexef fit-taħlita finali. Żied soluzzjoni ta' l-istokk suffiċjenti tas-sostanza li għandha tkun ittestjata biex b'hekk il-konċentrazzjoni DOC ta' 50 sa 400mg/litru tirriżulta fit-taħlita finali. Il-valuri tas-COD korrispondenti huma 100 sa 1 000mg/litru. Għamel bl-ilma tat-test għall-volum totali ta' litru sa erba' litri. Il-volum totali li għandu jintgħażel huwa dipendenti fuq in-numru ta' kampjuni li għandhom jittieħdu għad-determinazzjoni tad-DOC jew tas-COD u l-volumi neċessarji għall-proċedura analitika.

Normalment il-volum ta' żewġ litri jista' jitqies bħala sodisfaċenti. Minn ta' l-anqas reċipjent wieħed tal-kontroll (vojt) huwa magħmul biex jimxi parallel ma' kull serje tat-test; huwa fih biss tajn oħxon attivat u s-soluzzjoni tan-nutrijenti minerali magħmul bl-ilma tat-test għall-istess volum totali bħal fir-reċipjenti tat-test.

1.6.2 *L-andament tat-test*

Ir-reċipjenti tat-test jiġu aġitati bl-istrumenti li jħalltu li huma manjetiċi jew skrejjen li jinbuttaw taħt illuminazzjoni mxerrda jew f'kamra mdallma f'20 sa 25 C. L-għoti ta' l-arja huwa miksub bl-arja kompressata mnaddfa b'passatur tas-suf tal-qoton u bi flixkun tal-ħasil jekk ikun neċessarju. Għandu jkun żgurat li t-tajn oħxon ma joqgħodx u l-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu ma taqax taħt iż-2mg/litru.

Il-valur pH għandu jkun iċċekkjat f'intervalli regolari (e.ż. kuljum) u irranġat għal pH 7 sa 8, jekk ikun neċessarju.

It-telf mill-evaporazzjoni huwa magħmul eżatt qabel kull teħid tal-kampjun bl-ilma dejonizzat jew distillat fl-ammonti meħtieġa. Il-proċedura tajba għandha timmarka l-livell tal-likwidu fuq ir-reċipjent qabel ma jibda t-test. Il-marki l-ġodda huma magħmula wara kull teħid ta' kampjun (mingħajr l-għoti ta' l-arja u t-taħwid). L-ewwel kampjuni huma dejjem meħuda tlett siegħat wara l-bidu tat-test biex b'hekk ikun skopert l-assorbiment tal-materjali tat-test bit-tajn oħxon attivat.

L-eliminazzjoni tal-materjal tat-test huwa segwit bid-determinazzjoni tad-DOC jew tas-COD magħmula kuljum jew f'intervall ieħor regolari. Il-kampjuni mir-reċipjenti tat-test u l-vojt huma ffiltrati minn ġo filtru tal-karti maħsul sew. L-ewwel 5ml tas-soluzzjoni ffiltrata tat-test huma mormija. It-tajn oħxon li huwa diffiċli li tiffiltrah jista' jkun imneħħi qabel biċ-ċentrifugazzjoni għal 10 minuti. Id-determinazzjonijiet tad-DOC u s-COD huma magħmul doppji. It-test huwa magħmul sa 28 ġurnata.

Nota: Il-kampjuni li jibqgħu *turpid* jiġu ffiltrati minn ġo filtri tal-membran. Il-filtri tal-membran m'għandhom jerħu jew jassorbu xi materjal organiku.

Il-kontroll funzjonali tat-tajn oħxon attivat

Ir-reċipjent li fih sostanza magħrufa għandu jkun magħmul parallel ma' kull serje ta' testijiet biex b'hekk tkun iċċekkjata l-kapaċità funzjonali tat-tajn oħxon attivat. Id-*diethyleneglycol* kien misjub utli għal dan il-għan.

L-adattament

Jekk l-analiżi huma magħmula f'intervalli relattivament qosra (e.ż. kuljum), l-adattament għandu jkun rikonoxxut b'mod ċar mill-kurva tad-degradazzjoni (ara l-Figura 2). It-test għalhekk m'għandux jibda immedjatament qabel il-weekend.

Jekk l-adattament iseħħ fl-aħħar tal-perjodu, it-test jista' jittawwal sakemm id-degradazzjoni tkun kompleta.

Nota: Jekk tagħrif aktar vast fuq l-aġir tat-tajn oħxon huwa meħtieġ, l-istess tajn oħxon attivat huwa espost darba oħra għall-istess materjal tat-test skond il-proċedura li ġejja:

Itfi l-aġitatur u l-apparat li jagħti l-arja u ħalli t-tajn oħxon attivat joqgħod. Neħħi s-sustanza li tgħum f'wiċċ il-likwidu, imla sa żewġ litri bl-ilma tat-test, ħawwad għal 15-il minuta u ħalliħ jerġa joqgħod. Wara li s-sostanza li tgħum f'wiċċ il-likwidu tkun imneħħija, uża t-tajn oħxon li jibqa biex tirrepeti t-test bl-istess materjal skond 1.6.1.4 u 1.6.2, fuq. It-tajn oħxon attivat jista' wkoll ikun iżolat biċ-ċentrifugazzjoni minfloq bit-tqegħid.

It-tajn oħxon attivat jista' jkun imħallat mat-tajn oħxon frisk għal konċentrazzjoni ta' 0,2 sa 1 g piż niexef/litru.

Il-mezzi analitiċi

Normalment il-kampjuni jiġu ffiltrati minn ġo passatur tal-karti maħsul sew (għal ħasil uża l-ilma deonizzzat).

Il-kampjuni li jibqgħu mdardra jiġu ffiltrati minn ġo filtri tal-membran (0,45nm).

Il-konċentrazzjoni DOC hija determinata darbtejn fil-filtrati tal-kampjuni (l-ewwel 5ml jiġu mormija) permezz ta' l-istrument tat-TOC. Jekk il-filtrat ma jistax ikun analizzat fl-istess ġurnata, għandu jkun merfugħ fir-refriġeratur sal-ġurnata ta' wara. Irfigħ għal aktar tul ta' żmien ma jistax ikun rakkomandat.

Il-konċentrazzjoni COD hija determinata fil-filtrati tal-kampjuni b'arranġatura analitika tas-COD bil-proċedura deskritta fir-referenza (2), hawn taħt.

2. ID-DATA U L-VALUTAZZJONI

Il-konċentrazzjoni tad-DOC u/jew tas-COD huma determinati minn ta' l-anqas darbtejn fil-kampjuni skond 1.6.2 hawn fuq. Id-degradazzjoni fil-ħin T hija kkalkulata skond il-formula (bid-definizzjonijiet) mogħtija taħt 1.2 hawn fuq.

Il-limitu tad-degradazzjoni jiġi mnaqqas jew miżjud għall persentaġġ sħiħ l-aktar qrib. L-ammont tad-degradazzjoni miksub fl-aħħar tat-test huwa rappurtat bħala il-'Biodegradabilità fiz-Zahn – it-test ta' Wellens'.

Nota: Jekk id-degredazzjoni kompleta hija miksuba qabel il-ħin tat-test jispiċċa u dan ir-riżultat huwa konfermat b'analiżi oħra fil-ġurnata ta' wara, it-test jista' jkun konkluż.

3. IR-RAPPURTAR

3.1 Ir-rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, ikun fih dan li ġej:

— il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza,

— l-informazzjoni l-oħra kollha u r-riżultati sperimentali rigward is-sustanza ttestjata, is-sostanza referenza jekk kienet użata, u l-vojt,

— il-konċentrazzjoni wara tlett siegħat,

— il-kurva tal-biodegradazzjoni bid-deskrizzjoni,

— id-data u l-post fejn l-organiżmi tat-test kienu meħuda, l-istatus ta' l-adattament, il-konċentrazzjoni wżata, etc.,

— ir-raġunijiet xjentifiċi għal kwalunkwe tibdiliet fil-proċedura tat-test.

3.2 L-interpretazzjoni tar-riżultati

It-tneħħija tad-DOC (COD) li ssir gradwalment fuq medda ta' ġranet jew ġimgħat tindika li s-sustanza tat-test qiegħda tiġi biodegradata.

Madanakollu, l-assorbiment fiżiko-kimiku jista', f'ċerti każijiet, jilgħab rwol u dan huwa indikat fejn hemm it-tneħħija kompleta jew parzjali mill-bidu nett, fl-ewwel tlett siegħat, u d-differenza bejn il-likuri tal-kontroll u dawk li jgħumu f'wiċċ l-ilma tibqa f'livell baxx li ma jkunx mistenni.

Aktar testijiet huma neċessarji jekk għandu jkun hemm distinzjoni bejn il-biodegradazzjoni (jew il-biodegradazzjoni parzjali) u l-assorbiment.

Dan jista' jkun magħmul f'numru ta' modi, iżda dak l-aktar konvinċenti għandu jkun li tkun użata is-sustanza li tgħum f'wiċċ l-ilma jew it-tajn oħxon bħala sustanza użata għat-tilqim f'test tas-sett bażiku (preferibbilment f'test respirometriku).

Is-sustanzi tat-test li jagħtu tneħħija għolja u li ma tassorbix ta' DOC (COD) fit-test għandhom ikunu meqjusa bħala potenzalment biodegradabbli. It-tneħħija parzjali li ma tassorbix tindika li l-kimika hija minn ta' l-anqas soġġetta għal ċerta biodegradazzjoni. It-tneħħija baxxa jew l-ebda tneħħija tad-DOC (COD) tista' tkun kawża ta' l-inibizzjoni tal-mikroorganiżmi mis-sostanza tat-test u dan jista' wkoll ikun mikxuf bil-lisi u t-telf tat-tajn oħxon, li jagħti sostanzi li jgħumu fuq l-ilma li jkunu mdardra. Dan it-test għandu jkun ripetut billi tintuża konċentrazzjoi aktar baxxa tas-sostanza tat-test.

L-użu tal-metodu speċifiku għall-komposti jew tas-sostanza tat-test bit-tikketta 14 C tista' tħalli sensittività aktar għolja. Fil-każ tal-kompost tas-14C tat-test, l-irkuprar tal-14 CO 2 għandu jikkonferma li l-biodegradazzjoni seħħet.

Meta' r-riżulatati jingħataw fit-termini tal-biodegradazzjoni primarja, għandha tingħata spjegazzjoni jekk ikun possibbli fuq il-bidla ta' l-istruttura kimika li twassal għal telf fir-rispons tas-sustanza tat-test primarja.

The validation of the analytical method must be given together with the response found on the blank test medium.

4. **IR-REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, *Test Guideline 302 B*, Id-Deċiżjoni tal-Kunsill C (81) 30 finali.

(2) L-Annezz V C.9 Id-Degradazzjoni: Id-Domanda għall-Ossiġnu Kimiku, id-Direttiva tal-Kummissjoni 84/449/KEE, *Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Kommunitajiet Ewropej*, Nru L 251, 19. 9. 1984.

L-Appendiċi

L-EŻEMPJU TAL-VALUTAZZJONI

Il-kompost organiku:	L-aċidu *4-Ethoxybenzoic*
Il-konċentrazzjoni teoretika tat-test:	600mg/l
Id-DOC teoretiku:	390mg/l
Is-sostanza tat-tilqim	L-impjant tat-trattament tal-ħmieġ tad- drenaġġ
Il-konċentrazzjoni:	gramma waħda tal-materjal niexef/litru
L-istatus ta' l-adattament:	mhux adattat
L-analiżi:	Id-determinazzjoni tad-DOC
L-ammont tal-kampjuni:	3 ml
Is-sostanza tal-kontroll:	*Diethyleneglycol*
Il-kompost tat-toxiċità:	L-ebda effetti toxiċi taħt l-1 000mg/l It-test użat: Il-fermentazzjoni tat-tubi tat- test

Il-ħin tat-test	Is-sustanza tal-kontroll				Is-sustanza tat-test		
	Id-DOC vojt [1] mg/l	Id-DOC [1] mg/l	Id-DOC nett mg/l	Id-degradazzjoni %	Id-DOC [1] mg/l	Id-DOC nett mg/l	Id-degradazzjoni %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 sieġħat	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ġurnata	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 ġranet	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 ġranet	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 ġranet	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 ġranet	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 ġranet	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 ġranet	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 ġranet	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

[1] Il-valuri medji tad-determinazzjonijiet triplikati.

Figure 1

Examples of biodegradation curves

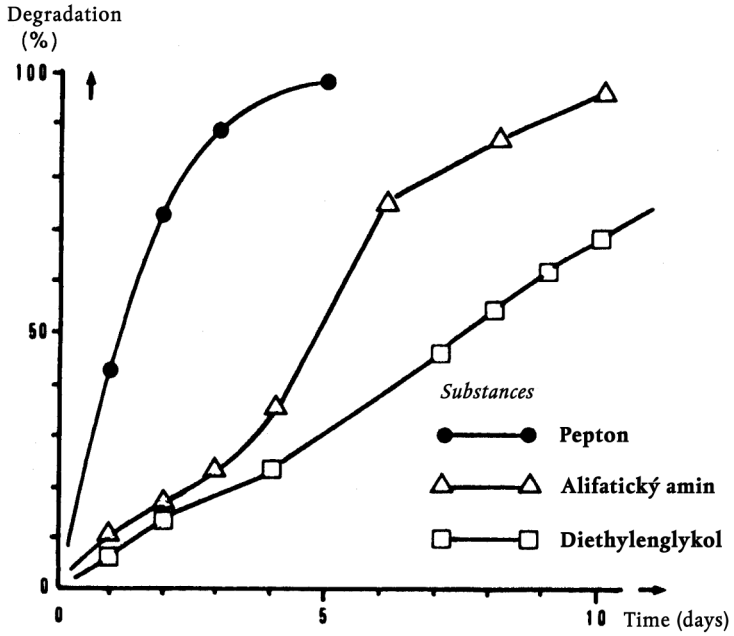
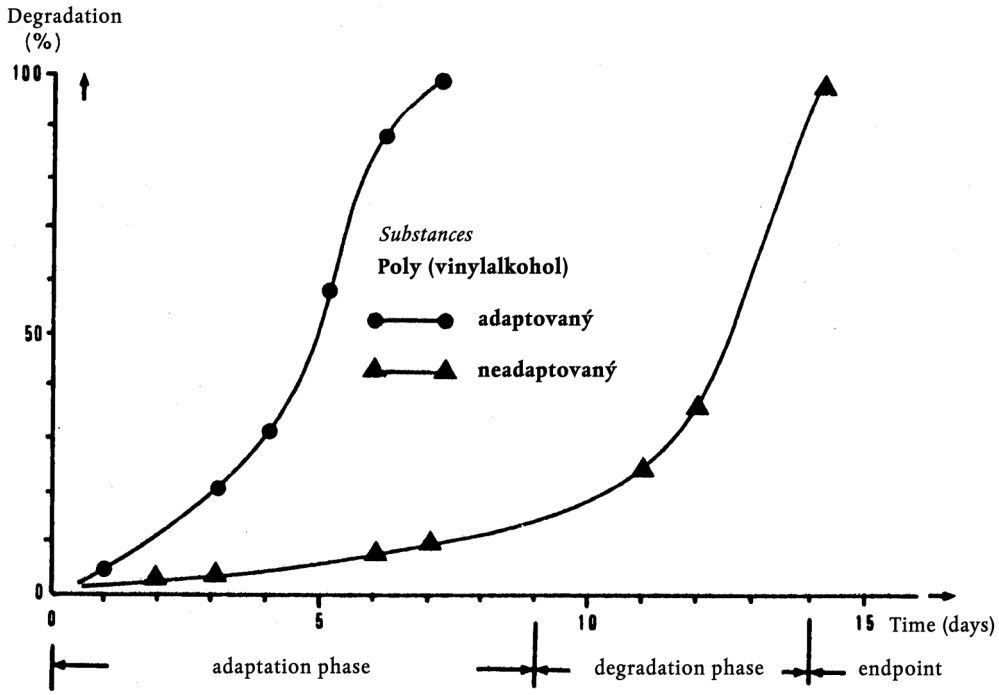


Figure 2

Examples of sludge adaptation



BIODEGRADAZZJONI

TESTIJIET ATTIVATI TA' SIMULAZZJONI TA' TAJN

1. **Metodu**

1.1 **Introduzzjoni**

1.1.1 *Rimarki Ġenerali*

Il-metodu huwa applikabbli biss għall-dawk is-sostanzi organiċi li, fil-konċentrazzjoni użata fit-testijiet:

— jinħallu fl-ilma sal-punt neċessarju għall-preparazzjoni tat-taħlita għat-test,

— għandhom pressjoni tal-fwar negliġibbli fil-kondizzjonijiet tat-testijiet,

— huma inibittorji għall-batteri.

Informazzjoni fuq il-proporzjonijiet relattivi tal-komponenti l-iktar importanti tal-materjal tat-test hija importanti sabiex jiġu interpretati r-riżultati miksuba, b'mod partikolari f'dawk il-każijiet fejn ir-riżultati huma baxxi jew marġinali.

Informazzjoni fuq it-tossiċità tas-sostanza għall-micro-organiżmi hija mixtieqa għall-interpretazzjoni tar-riżultati baxxi u fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet xierqa għat-test.

1.1.2. *Stabbiliment tal-biodegrabilità aħharija (analiżi DOC/COD)*

L-għan ta' dan il-metodu huwa li jistabbilixxi l-biodegrabilità aħharija billi jitkejjel ir-rimi tas-sostanza u xi metaboliti f'impjant mudell attivat tat-tajn u b'konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal >12 mg DOC/litru (jew madwar 40 mg COD/litru); 20 mg DOC/litru jidher illi huwa l-aħjar. (DOC = Karbon Organiku Maħlul; COD = Bżonn ta' l-ossiġinu kimikali).

Il-kontenut tal-karbon organiku (jew il-bżonn ta' l-ossiġinu kimikali) tal-materjal użat fit-test għandu jiġI stabbilit.

1.1.3. *Stabbiliment tal-biodegrabilità primarja (analiżi speċifika)*

L-għan tal-metodu huwa li tiġi stabbilita il-biodegrabilità primarja tas-sostanza f'impjant mudell attivat tat-tajn, f'konċentrazzjoni ta' madwar 20mg/litru, bl-użu ta' metodu analitiku speċifiku (tista' tintuża konċentrazzjoni ogħla jew iktar baxxa jekk il-metodu analitiku u l-konsiderazzjoni tossika tippermetti). Dan jippermetti li ssir stima tal-biodegrabilità primarja ta' sostanza (skompariment ta' l-istruttura kimikali oriġinali).

L-għan ta' dan il-metodu m'huwiex li jiġi stabbilit il-mineralizzazzjoni tas-sostanza ttestjata.

Metodu analitiku adegwat għall-istabbiliment tas-sostanza ttestajata għandu jkun għad-disposizzjoni.

1.2 **Definizzjonijiet u unitajiet**

1.2.1. *Analiżi DOC/COD*

Il-livell ta' rimi tas-sostanza huwa mogħti:

$$DR = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\,\% \qquad [1\ (a)]$$

where:

DR = degree of removal in percent DOC (or COD) within the given mean retention time with respect to the test material,

T = concentration of the test material in the influent in mg DOC/litre (or mg COD/litre),

E = DOC (or COD) concentration in the effluent of the test unit in mg DOC/litre (or mg COD/litre),

E_0 = DOC (or COD) concentration in the effluent of the blank unit in mg DOC/litre (or mg COD/litre)

The degradation is stated as the percentage DOC (or COD) removal within the given retention time with respect to the test material.

1.2.2 *Analiżi speċifika*

Il-perċentwali ta' eliminazzjoni tas-sostanza ttestjata mill-fażi akwea (Rw) fil-ħin medju taż-żamma huwa mogħti permezz ta':

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [1\ (b)]$$

fejn:

C_I = konċentrazzjoni tas-sostanza fl-iffluwenti ta' l-unità ta' l-ittestjar (mg sostanza/litru, stabbilita minn analiżi speċifika),

C_O = konċentrazzjoni tas-sostanza fl-effluwneti ta' l-unità ta' l-ittestjar (mg sostanza/litru, stabbilita minn analiżi speċifika)

1.3 **Sostanzi ta' referenza**

F'ċerti każijiet fl-investigazzjoni ta' sostanza ġdida, sostanzi ta' referenza jistgħu jkunu ta' użu, sostanzi ta' referenza speċifiċi, pero', għadhom ma jistgħux jiġu rakkomandati.

1.4 **Prinċipju ta' metodi ta' ttestjar**

Sabiex tiġi stabbilita il-biodegrabilità aħħarija, żewġ unitajiet piloti attivati tat-tajn (testijiet konfermatorji OECD jew unitajiet ta' kontenituri poruži) għandhom isiru b'mod parallel. Is-sotanza ttestjata għandha tiġi miżjuda ma' l-iffluwent (drenaġġ sintetiku jew domestiku) ta' wieħed mill-unitajiet, filwaqt li l-ieħor jirċievi d-drenaġġ biss. Għall-istabbiliment tal-biodegradazzjoni primarja b'analiżi speċifika fl-iffluwent jew l-affluwent, tiġI użata unita' waħda biss.

Il-konċentrazzjonijiet DOC (jew COD) huma kkalkolati fl-effluwenti, jew il-konċentrazzjonijiet tas-sostanza huma determinati b'analiżi speċifika.

Id-DOC meħtieġ sabiex ikun ittestjat il-materjal m'huwiex imkejjel imma sempliċiment mogħti.

Meta l-kejl ta' DOC (jew COD) huwa miksub, id-differenza fil-medja tal-konċentrazzjonijiet bejn it-testijiet u l-effluwenti kkontrollati hija assunta li tkun materjal ta' l-ittestjar iggradad inqas.

Meta jsiru l-analiżi speċifiċi, l-bidla fil-konċentrazzjoni tal-molekula oriġinali tista' tiġi mkejjla (biodegradazzjoni primarja)

L-unitajiet jistgħu jiġu mħaddma bil-'mod ta' unitajiet kkopjati', bi proċedura transinolkulari.

1.5. **Kriterji tal-kwalità**

Il-konċentrazzjoni tal-bidu tas-sostanza tiddependi fuq it-tip ta' analiżi magħmula u l-limitazzjoni tagħha.

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu ta' ttestjar**

1.6.1. *Preparazzjoni*

1.6.1.1. Apparat

Hemm bżonn par unitajiet ta' l-istess tip b'eċċezzjoni ta' meta jsiru analiżijiet speċifiċi. Jistgħu jiġu użati żewġ tipi ta' apparat:

Test ta' konferma ta' l-OECD

L-apparat (appendiċi 1) jikkonsisti f'kontenitur (A) li jżomm id-drenaġġ sintetiku, pompa dożatriċi (B), kontenitur ta' aerjazzjoni (C), separatur (D), pompa ta' l-arja (E), sabiex tirriċikla t-tajn attivat, u kontenitur (F) li jilqa' fih l-effluwent ittrattat.

Il-kontenituri (A) u (F) għandhom ikunu tal-ħġieġ jew plastik xieraq u li jżommu ta' l-anqas 24 litru. Il-pompa (B) għandha tipprovdi fluss kostanti ta' drenaġġ sintetiku għall-kontenitur ta' aerjazzjoni; tista' tiġi użata kwalunkwe sistema xierqa, sakemm il-fluss li dieħel u l-konċentrazzjoni jkunu assigurati.

Waqt l-operat normali l-għoli tas-separatur (D) għandu jkun b'mod li l-volum li jinsab fil-kontenitur ta' aerjazzjoni huwa ta' taħlita ta' tlett litri. Kubu ta' aerjazzjoni li fih jgħaqad il-materjal (G) għandu jkun sospiż fil-kontenitur (C) fil-vertiċi tal-kon. Il-kwantità ta' arja li tgħaddi mill-kontenitur ta' aerjazzjoni tista' tiġi kkontrollata permezz ta' arloġġ li jaqra l-fluss.

Il-pompa ta' l-arja (E) għandha tiġi magħmula b'mod li t-tajn attivat mis-separatur huwa kontinwament u regolament irriċiklat għall-kontenitur ta' aerjazzjoni (C).

' Kontenitur poruż'

Il-kontenitur poruż huwa magħmul minn pjanċi ta' polietilene poruż (2mm oħxon, d-daqs massimu tal-pori 95 μm), maħdum f'erba' ċilindri b'dijametru ta' 14 cm u b'bażi f'forma ta' 45° (Tabelli 1 u 2 ta' l-Appendiċi 2). Il-kontenitur poruż huwa mqiegħed f'kontenitur ieħor li ma jgħaddix likwidu minnu tal-plasitk adegwat b'dijametru ta' 15 cm, b'tobqa minn fejn joħroġ il-likwidu f'għoli ta' 17,2 cm fuq il-parti ċilindrika, li tiddetermina l-volum (3 litri) fil-kontenitur poruż. Għandu jkun hemm ukoll ċirku iebes li jservi ta' support magħmul minn plastik adegwat fil-quċċata tal-kontenitur ta' ġewwa, sabiex ikun hemm spazju effluwenti ta' 0,5 cm bejn il-kontenitur ta' ġewwa u dak ta' barra,

Il-konteniturі poruż jistgħu jkunu mqiegħda fil-bażi ta' banju ta' l-ilma termostatikament ikkontrollat. Għandu jkun hemm fornitura ta' l-arja għall-bażi tal-kontenitur ta' ġewwa li fuqu jitqiegħdu diffużaturi adegwati.

Il-konteniturі (A) u (E) għandhom ikunu tal-ħġieġ jew plastik adegwat u li jżommu ta' l-inqas 24 litru. Il-pompa (B) għandha tipprovdi fluss kostanti ta' drenaġġ sintetiku għall-kontenitur ta' l-aerjazzjoni; tista' tiġi użata kwalunkwe sistema xierqa, sakemm il-fluss tad-dħul u l-konċentrazzjoni huma assigurati.

Konteniturі poruż żejda huma bżonnjuż sabiex jirrimpjazzaw oħrajn li jistgħu jiġu miżduda waqt l-użu; il-konteniturі miżduda huma mnaddfa permezz ta' immersjoni ta' 24 siegħa f'taħlita ipokolritika imbagħad b'ħassla sħiħa fl-ilma tal-vit.

1.6.1.2. Filtrazzjoni

Apparat ta' filtrazzjoni bil-membrena, u filtri tal-membrena bid-daqs tal-pori ta' 0,45 μm. Il-filtri tal-membrena huma xierqa jekk huwa assigurat li dawn ma jirilaxxawx il-karbon u li ma jixrobux mit-taħlita waqt l-istadju tal-filtrazzjoni.

1.6.1.3. Drenaġġ

Jista' jiġi użat dak sintetiku jew dak domestiku.

Eżempju ta' drenaġġ sintetiku

Ħallat f'litru ta' ilma tal-vit:

Pepton:	160 mg,
Estratti mill-laħam:	110 mg,
Urea:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl2.2H2O:	4 mg,
MgSO4.7H2O:	2 mg,
K2HPO4:	28 mg.

Drenaġġ domestiku

Dan għandu jkun miġbur kuljum miż-żejjed tat-tank primarju fejn id-drenaġġ joqgħod ta' impjant għat-trattament li predominament jitratta drenaġġ domestiku.

1.6.1.4 Stokk tat-taħlita tal-materjal għall-ittestjar.

Għandha tiġI ppreparata taħlita ta' materjal għall-ittestjar, e.g. 1% biex tiżdied ma' l-untità ta' l-ittestjar. Il-konċentrazzjoni tal-materjal għandha tiġi stabbilita, sabiex il-volum adegwat li jiżdied mad-drenaġġ jew direttament ma' l-unità permezz ta' pompa oħra sabiex tagħti l-konċentrazzjoni tat-test.

1.6.1.5 Inoculum

Kumment: Meta jiġi użat drenaġġ domestiku, ma jkunx hemm għalfejn li jintuża *inoculum* ta' konċentrazzjoni baxxa ta' batteri, imma jista' jiġi użat tajn attivat.

Jistgħu jiġu użati varjeta' ta' inocula.

Qed jingħataw tlett eżempji ta' *inculum* adegwat:

(a) Inoculum minn effluwent sekondarju

L-inoculum għandu jkun miksub minn effluwent sekondarju ta' kwalità tajba miksub minn impjant ta' trattament li jipproċessa predominalment drenaġġ domestiku. L-effluwent għandu jinżamm taħt kondizzjonijiet aerjużi fil-perjodu ta' bejn meta jittieħed il-kampjun u l-użu. Sabiex ikun preparat l-inoculum, il-kampjun huwa ffiltrat permezz ta' filtru oħxon, bl-ewwel 200 ml jintremew. Il-filtrat għandu jinżamm aerjat sakemm jintuża. L-inoculum għandu jintuża fil-ġurnata li fiha dan jiġI miġbur. Għandhom ta' l-anqas jintużaw 3 ml għall-inokulazzjoni.

(b) Inoculum compost

Inoculum minn effluwent sekondarju:

Ara d-deskrizzjoni hawn fuq.

Inoculum mill-ħamrija:

100 g ta' ħamrija tal-ġnien (fertili u mhux sterili) huma sospiżi f'1 000 ml ta' ilma tax-xorb ħieles mill-kloru. (Ħamrija b'parti kbira ta' tafal, ramel jew ħumus m'humiex adegwati.) Wara li dawn jitħalltu, s-sospensjoni għandha titħalla toqgħod għall-30 minuta. It-taħlita hija ffiltrata permezz ta' karta ħarxa tal-filtru, bl-ewwel 200 ml jkunu mormija. Il-filtrat għandu jinżamm aerjat immedjatament sakemm dan jintuża. L-*inoculum* għandu jintuża fl-istess ġurnata li dan ikun inġabar.

Inoclum mill-ilma tal-wiċċ:

Inoculum ieħor għandu jkun miġbur mill-ilma tal-wiċċ mesosaprobiku. Il-kampjun huwa filtrat permezz ta' karta ħarxa tal-filtru bl-ewwel 200 ml jkunu mormija. Il-filtrat għandu jinżamm aerjat immedjatament sakemm dan jintuża. L-*inoculum* għandu jintuża fl-istess ġurnata li dan ikun inġabar.

Volumi ugwali tat-tlett *inocula* huma mħallta flimkien, u b'hekk jinġabar *inoculum* finali minn din it-taħlita. Ta' l-anqas 3 ml għandhom jintużaw għal din l-inokulazzjoni.

(c) Inoculum minn tajn attivat

Volum (ta' mhux aktar minn 3 litri) ta' tajn attivat (solidi sospiżi f'kontenut sa 2,5 g/litru) meħud mit-tank ta' l-aerjazzjoni ta' l-impjant li predominament jitratta drenaġġ domestiku jista' jintuża bħala inoculum.

1.6.2. *Proċedura*

It-test isir fit-temperatura tal-kamra; dan għandu jinżamm f'temperatura ta' bejn 18 u 25° C.

Jekk huwa xieraq, it-test jista' jsir f'temperatura iktar baxxa (sa' 10° C); jekk is-sostanza ddegradat, m'hemmx bżonn ta' aktar xogħol. Jekk, madankollu, is-sotanza ma ddegradatx, it-test għandu jsir b'temperatura stabbli ta' bejn 18 u 25° C.

1.6.2.1. Perjodu ta' running-in: Formazzjoni tat-tajn/stabilizazzjoni ta' l-unitajiet

Il-perjodu tat-tkabbir/stabilizazzjoni tat-tajn huwa l-perjodu li fih il-konċenrtazzjoni tas-solidi sospiżi tat-tajn attivat u l-effiċċjenza tal-progress ta' l-unitajiet lejn stat stabbli taħt il-kondizzjonijiet ta' l-operat użat.

Il-perjodu tar-*running-in* li jdum minn meta s-sostanza tat-test hija l-ewwel miżjuda saż-żmien meta t-tneħħija tagħha tlaħħaq ċertu punt (valur relattivament kostanti). Dan il-perjodu m'għandux jaqbeż is-sitt ġimgħat.

Il-perjodu evalwattiv huwa ta' tlett ġimgħat minn meta t-tneħħija tas-sostanza ta' l-ittestjar tlaħħaq valur relattivament kostanti u normalment għoli. Għall-dawk is-sostanzi li juru ftit jew xejn degradazzjoni fl-ewwel sitt ġimgħat, il-perjodu evalwattiv ikun dak tat-tlett ġimgħat li fadal.

Inizjalment, għandhom jimtlew l-unitajiet, jew l-unità, bżonnjuži għal test wieħed bl-*inoculum* imħallat ma' l-effluwent.

L-aerjatur (u l-pompa ta' l-arja (E) fil-każ ta' unitajiet ta' testijiet konfermatorji OECD) u l-pompa dożattriċi (B) għandhom jinxtgħelu.

L-iffluwent mingħajr is-sostanza li għandu jiġi ttestjat għandu jgħaddi minn kontenitur ta' aerjazzjoni (C) jew bir-rata ta' litru fis-siegħa jew bir-rata ta' nofs litru fis-siegħa; dan jgħati l-ħin medju ta' ritensjoni ta' tlett jew sitt siegħat.

Ir-rata ta' aerjazzjoni għandha tkun irregolata sabiex il-kontenut tal-kontenitur (C) jinżamm kostanti f'sospenzjoni filwaqt li l-kontenut ta' l-ossiġinu mħallat jkun ta' l-anqas ta' 2 mg/litru.

Għandu jiġi evitat li jsir 'foaming' b'mezzi adegwati. M'għandhomx jintużaw prodotti kontra l-'foaming' li jdgħajfu t-tajn attivat.

It-tajn li jkun akkumula madwar il-quċċata tal-kontenitur ta' aerjazzjoni (C) (u, fil-każ ta' l-unitajiet tat-test konfermatorju OECD, fil-bażi tal-kontenitur li fih is-sospensjoni toqgħod (D), u fiċ-ċirkwit ta' ċirkolazzjoni) għandu jingħata lura lit-taħlita ta' l-anqas darba kuljum billi jinkines jew permezz ta' xi mod ieħor adegwat.

Meta t-tajn ma joqgħodx, id-densità tiegħu tista' tiżdied permezz ta' porzjonijiet ta' 2 ml ta' taħlita ta' 5% kloru tal-ħadid, u ripetut kif xieraq.

L-effluwent huwa miġbur f'kontenitur (E jew F) għal 20 jew 40 siegħa, u jittiħed kampjun wara li jkun imħallat sew. Il-kontenitur (E jew F) għandu jiġi mnaddaf bil-għaqal.

Sabiex tkun kontrollata l-effiċjenza tal-proċess, il-bżonn ta' l-ossiġinu kemkali (COD) jew il-karbon organiku mħallat (DOC) tal-filtrat tal-effluwenti akkumulat għandu jiġi mkejjel ta' l-anqas darbtejn fil-ġimgħa, kif ukoll dak ta' l-iffluwent iffiltrat (bl-użu ta' membrana bid-daqs tal-pori ta' 0, 45μm, l-ewwel 20 ml (bejn wieħed u ieħor) tal-filtrat jintremew)

It-tnaqqis fil-COD jew DOC għandhom jikkompensaw 'l xulxin meta tintlaħaq degradazzjoni regolari kuljum.

Il-kontenut ta' materja niexfa tat-tajn attivat fit-tank ta' aerjazzjoni għandu jkun stabbilit darbtejn fil-ġimgħa (fi g/litru). L-unitajiet jistgħu jkunu operati f'wieħed minn żewġ modi: il-kontenut tal-materja niexfa fit-tajn attivat jkun stabbilit darbetjn fil-ġimgħa, u, jekk hu aktar minn 2,5 g/litru, it-tajn attivat żejjed għandu jintrema, jew inkella 500 ml tat-taħlita huwa mormi minn kull kontenitur kuljum sabiex jingħata perjodu ta' ritenzjoni medju tat-tajn ta' sitt ijiem.

Meta il-parametri mkejla u stmati (effiċjenza tal-proċess (fit-tneħħija COD jew DOC). Il-konċentrazzjoni tat-tajn, il-kapaċità li t-tajn għandu biex joqgħod, it-taħlit tal-iffluwenti, eċċ.) taż-żewġ unitajiet huma suffiċjentement stabbli, s-sostanza tat-test tista' tkun introdotta fl-iffluwent ta' wieħed mill-unitajiet, skond 1.6.2.2.

Alternattivament, is-sostanza tat-test tista' tkun miżjuda fil-bidu tal-perjodu li fih jitabbar it-tajn (1.6.2.1), speċjalment meta t-tajn huwa miżjud bħala l-inoculum.

1.6.2.2. Proċedura tat-test

Il-kondizzjonijiet ta' l-operat tal-perjodu tar-*running-in* għandhom ikunu miżmuma u għandha tiżdied biżżejjed taħlita (madwar 1%) tal-materjal tat-test ma' l-iffluwent ta' l-unità tat-test sabiex il-konċentrazzjoni mixtieqa tal-materjal tat-test (madwar 10 sa 20 mg DOC/litru jew 40 mg COD/litru) fid-drenaġġ tkun miksuba. Dan jista' jsir billi titħallat it-taħlita tad-drenaġġ kuljum permezz ta' sistema ta' ppumpjar. Il-konċentrazzjoni tista' tintlaħaq progressivament. Jekk ma jkunx hemm effetti tossiċi għas-sostanza ttestjata fuq it-tajn attivat, jistgħu jkunu ttestjati konċentrazzjonijiet oħla.

L-unità vojta hija mogħtija l-iffluwent, mingħajr sostanzi oħrajn miżjuda, volumi xierqa ta' l-effluwenti għandhom jkunu analiżżati u ffiltrati permezz ta' filtri tal-membrena (0,45 µm) bl-ewwel 20 ml (jew madwar) tal-materjal ffiltrat jkun mormi.

Il-kampjuni ffiltrati għandhom jkunu analiżżati fl-istess jum, inkella għandhom jiġu ppreżervati bi kwalunkwe metodu xieraq, per eżempju bl-użu ta' 0,05 ml ta' 1% kloru tal-merkurju ($HgCl_2$) għal kull 10 ml ta' taħlita ffiltrata jew billi jiġu miżmuma f'temperatura minn 2 sas 4°C sa 24 siegħa, jew inqas minn -18°C għall-perjodi itwal.

Il-perjodu tar-*running-in* biż-żieda tas-sostanza ttestjata, m'għandu jeċċedi sitt ġimgħat u l-perjodu ta' valutazzjoni m'għandux ikun iqas minn tlett ġimgħat, i.e. għandu jkun hemm madwar 14 sa 20 determinazzjoni għall-kalkolazzjonijiet tar-riżultat finali.

Mod ta' unitajiet akkoppjati

L-akkoppjament ta' l-unitajiet jinkiseb billi jitħalltu 1,5 litri tat-taħlita (inkluż t-tajn) mit-tankijiet ta' aerjazzjoni tat-tajn attivat bejn iż-żewġ unitajiet darba kuljum. Fil-każ ta' materjali ta' l-ittestjar li jassorbu ħafna, 1,5 litri ta' likwidu supernatant huma miġbuda mil-kontenituri fejn toqgħod it-taħlita u mferra fil-kontenitur tat-tajn attivat ta' l-unità l-oħra.

1.6.2.3. Analiżi

Jistgħu jsiru żewġ tipi ta' analiżi sabiex tiġi segwita n-natura tas-sostanza:

DOC u COD

Il-konċentrazzjonijiet DOC għandhom isiru b'mod doppju ma' l-analiżi tal-karbonju u/jew il-valuri COD skond il-punt (2).

Analiżi speċifika

Il-konċentrazzjonijiet tas-sostanzi ttestjati jinstabu b'metodu analitiku xieraq. Fejn possibbli, għandha ssir seterminazzjoni speċifika tas-sostanza mixruba fuq it-tajn.

2. DATA U VALUTAZZJONI

2.1 Mod ta' unitajiet akkoppjati

Meta jkun qed jintuża l-'mod ta' unitajiet akkoppjati', il-gradi ta' kuljum tat-tneħħija DR huma kkalkolati skond 1.2.1.

Il-gradi ta' kuljum tat-tneħħija DR huma kkoreġuti għall-DRc għat-trasferiment tal-materjal minħabba l-proċedura ta' transinokulazzjoni bil-formula ġ2ħ għall-perjodu ta' retenzjoni ta' tlett siegħat jew formula ġ3ħ għall-dak ta' sitt siegħat.

$$DRc = \frac{8}{7}\ DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3}\ DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Il-medja ta' serje ta' valuri DRc hija kkalkolata u għandha tiżdied id-derivazzjoni standard skond il-formula ġ4ħ

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\Sigma_{i=1}^{n}\ \left(D\overline{R} - DRc_i\right)^2}{n-1}} \quad [4]$$

fejn:

S_{DRc} = devjazzjoni standard tas-serje ta' valuri DRc,

$D\overline{R}c$ = meda tal-valur DRc,

n = numru ta' determinazzjonijiet.

Valuri li huma 'l bogħod mill-medja tas-serje DRc għandhom jiġu mneħħija skond proċedura statistikali xierqa, e.g. Nalimov (6), fil-livell ta' probabbilità ta' 95% u l-medja ta' d-devjazzjoni standard tad-data mingħajr valuri li huma 'l bogħod mill-medja hija kkalkolata.

Ir-riżultat finali huwa kkalkolat bil-formula ġ5ħ bħala

$$DRc = D\overline{R}c \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}\ s_{DRc}} \quad [5]$$

fejn:

t_{n-1}; α = il-valur tat-tabella ta' *t* għall-valur *n* ta' koppji ta' E u E_O u konfidenza statistika P (P = 1 – α) fejn P huwa 95 % (1).

Ir-riżultat huwa mogħti bħala l-medja bil-limitu ta' tolleranza fil-livell tal-probabilità ta' 95%, id-devjazzoni standard rispettiva u n-numru ta' l-informazzjoni DRc mingħajr valuri li huma 'l bogħod mill-medja, u n-numru ta' dawn l-istess valuri, e.g.

DRc = 98,6 ± 2,3% tneħħija DOC,

s = 4,65% tneħħija DOC,

n = 18,

x = numru ta' riżultati li huma 'l bogħod mill-medja.

2.2. **Mod ta' unitajiet mhux akkoppjati**

L-effiċjenza ta' dawn l-unitajiet jistgħu jkunu kkontrollati kif ġej:

$$\text{Perċentwali ta' tneħħija ta' COD jew DOC} = \frac{\text{COD jew DOC tad-drenaġġ - COD jew DOC ta' l-effluwent}}{\text{COD jew DOC drenaġġ}} \times 100$$

Dawn it-tneħħijiet ta' kuljum jistgħu jitpinġew grafikament sabiex jikxfu kwalunkwe imġieba, e.g. akklimatizzazzjoni.

2.2.1. *Użu ta' determinazzjonijiet COD/DOC*

Il-grad ta' tneħħija ta' kuljum ta' DR huwa kkalkolat skond il-punt 1.2.1.

Il-medja tas-serje ta' valuri DR hija kkalkolata; aktar minn dan, id-devjazzjoni standard hija kkalkolata skond:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\ \left(D\overline{R} - DR_i\right)^2}{n-1}} \quad [6]$$

fejn:

s_{DR} = devjazzjoni standard ta' serje ta' valuri DR_i,

$D\overline{R}$ = medja ta' valuri DR_i,

n = numru ta' determinazzjonijiet.

Valuri li huma 'l boghod mill-medja tas-serje DR jiġu mneħħija skond proċedura statistikali adegwata, e.g. Nalimov (6) fil-livell ta' probabilità ta' 95%, u l-medja tad-devjazzjoni standard tal-valuri DR mingħajr valuri li huma 'l boghod mill-mejda hija ikkalkolata.

Ir-riżultat finali huwa kkalkolat permezz tal-formula ġ7ħ:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}s_{DR}} \quad [7]$$

fejn:

$t_{n-1};\alpha$ = il-valur tat-tabella ta' t għall-valur n ta' koppji ta' E u EO u konfidenza statistika P (P = 1 – α) fejn P huwa 95 % (1).

The result is stated as the mean with tolerance limits at the 95Ž % probability level, the respective standard deviation and the number of data of the outlier‐free DRc data set, and the number of outliers, e.g.

DR = (98,6 ± 2,3%) DOC removal,

s = 4,65% DOC removal,

n = 18,

x = number of outliers.

2.2.2. *Using specific analysis*

The percentage of elimination of the tested substance from the aqueous phase (Rw) is calculated according to 1.2.2.

3. RAPPORTI

3.1 Rapporti tat-testijiet

Ir-rapport tat-testijiet għandu jkollu, jekk hu possibbli, dan li ġej:

— il-formula mogħtija fl-Appendiċi 3, li turi l-kondizzjonijiet ta' l-operat tat-test,

— liema apparat kien qed jintuża (test konfermatorju OECD jew tal-kontenitur poruż),

— liema mod ta' l-operat intuża, dak akkoppjat jew dak li m'huwiex,

— liema tip ta' drenaġġ: sintetiku jew domestiku - fil-każ ta' drenaġġ domestiku, d-data u l-post tal-kampun,

— liema inoculum, bid-data u l-post tal-kampun,

— dikjarazzjoni bid-deskrizzjoni tal-metodu analitiku ta' l-analiżi speċifiċi li saru,

— tabella grafika tat-tneħħija COD jew DOC mal-ħin, inklużi il-perjodi tar-*running-in* u l-perjodu ta' valutazzjoni,

— rekupru analitiku tas-sostanza ttestjata bħala COD jew DOC fit-taħlita,

— jekk saru l-analiżi speċifiċi, tabella grafika tal-perċentwali ta' tneħħija tas-sostanza ttestjata mal-faži akwea u l-ħin (perjodi ta' *running-in* u ta' valutazzjoni),

— il-medja tat-tneħħija tas-sostanzi ttestjati DOC jew COD u d-devjazzjoni standard huma kkalkolati mir-riżultati tal-perjodu ta' valutazzjoni, i.e. fejn ikun hemm tneħħija standard tal-materjal tat-test jew perjodu stabbli ta' l-operat,

— tabella grafika tat-tajn attivat mal-ħin,

— kwalunkwe kumment fir-rigward tat-tajn attivat (rimi ta' tajn eċċessiv, preżenza ta' bulking, $FeCl_3$, etc.),

— konċentrazzjoni tas-sostanza użata fit-test,

— kwalunkwe riżultati li jirrigwardjaw l-analiżi magħmula fuq it-tajn,

— l-informazzjoni kollha u r-riżultati ta' l-esperimenti magħmula fuq is-sostanza tat-test u tas-sostanza ta' referenza jekk intużat,

— raġunijiet xjentifiċi għal xi tibdil tal-proċediment.

3.2 **Interpretazzjoni tar-riżultati**

Tneħħija baxxa tal-materjal ttestjat mill-faži akewa jista' jiġri minħabba l-inibizzjoni tal-mikrorganiżmi missostanza ttestjata. Dan jista' jidher ukoll mill-leża u mit-telf tat-taħlita, li tagħti supernatant turbidu, minn nuqqas ta' tneħħija ta' l-effiċjenza COD (jew DOC) mill-impjant pilota.

L-assorbiment fiżiku-kemikali jista' jkollu effett. Differenzi bejn l-azzjoni bioloġika fuq il-molekula u l-assorbiment fiżiku-kemikali jista' jidher minn analiżi magħmula mit-tajn wara desorzjoni adegwata.

Testijiet oħrajn huma neċessarji jekk trid issir distinzjoni bejn il-biodegradazzjoni (jew biodegradazzjoni parzjali) u assorbiment.

Dan jista' jseħħ f'numru ta' modi, imma l-iktar wieħed konvinċenti huwa l-użu ta' supernatant bħala inoculum fuq test bażi (preferibbilment test respirometriku).

Jekk tiġi osservata tneħħija għolja ta' DOC jew COD, dan ikun minħabba l-biodegradazzjoni filwaqt, bi tneħħija baxxa, il-biodegradazzjoni ma tingħarafx mill-eliminazzjoni. Per eżempju, jekk kompost solubbli juri kostant ta' assorbiment għoli ta' 98% u r-rata ta' r-rimi tat-tajn żejjed hija ta' 10% kull jum, hija possibli eliminazzjoni sa' 40%; b'rata ta' rimi tat-tajn żejjed ta' 30% minħabba l-assorbiment fuq it-tneħħija bit-tajn żejjed li jista' jammonta għall-65% (4).

Meta tkun qed tintuża analiżi speċifika, għandha tingħata attenzjoni lejn ir-rabta bejn l-istruttura tas-sostanza u l-analiżi speċifika użata. F'dan il-każ, il-fenomenu osservat ma jistgħax jiġi interpretat bħala mineralizzazzjoni tas-sostanza.

4. **REFERENZI**

1) OECD, Pariġi, 1981, *Linjigwida dwar it-testijiet 303 A,* Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali.

2) Anness V C9 Test ta' Degradazzjoni — Ossiġinu Kimiku Meħtieġ. Direttiva tal-Kummissjoni 84/449/KEE, Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej, Nru L 251, 19. 9. 1984.

3) Painter, H. A., King, E. F., *WRC Metodu tal-Kontenitur Poruż għall-istima tal-biodegradibilità,* Rapport Tekniku TR70, Ġunju 1978, Ċentru tar-Riċerka fuq l-Ilma, r-Renju Unit.

4) Wierich, P., Gerike, P., L-andantament tal-komposti solubbli, rekalċitranti u assorbenti fl-impjanti tat-tajn attivat, *Sigurtà Ecotossikali Ambjentali,* vol. 5, Nru *1,* Ġunju 1981, pp. 161 sa 171.

5) Direttivi tal-Kunsill nru. 82/242/KEE u 82/243/KEE, *Ġurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej,* Nru. L 109, 22. 4. 1982, li jemenda d-Direttivi tal-Kunsill Nru. 73/404/KEE u 73/405/KEE dwar il-biodegrabilità taddeterġenti, *Ġurnali Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej*. Nru. L 347, 17. 12. 1973.

6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißetests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmetoden, *Fresenius-Zeitschrift fur Analytiche Chemie,* 303 (1980), pp. 406 to 408.

Appendiċi 1

Tabella 1

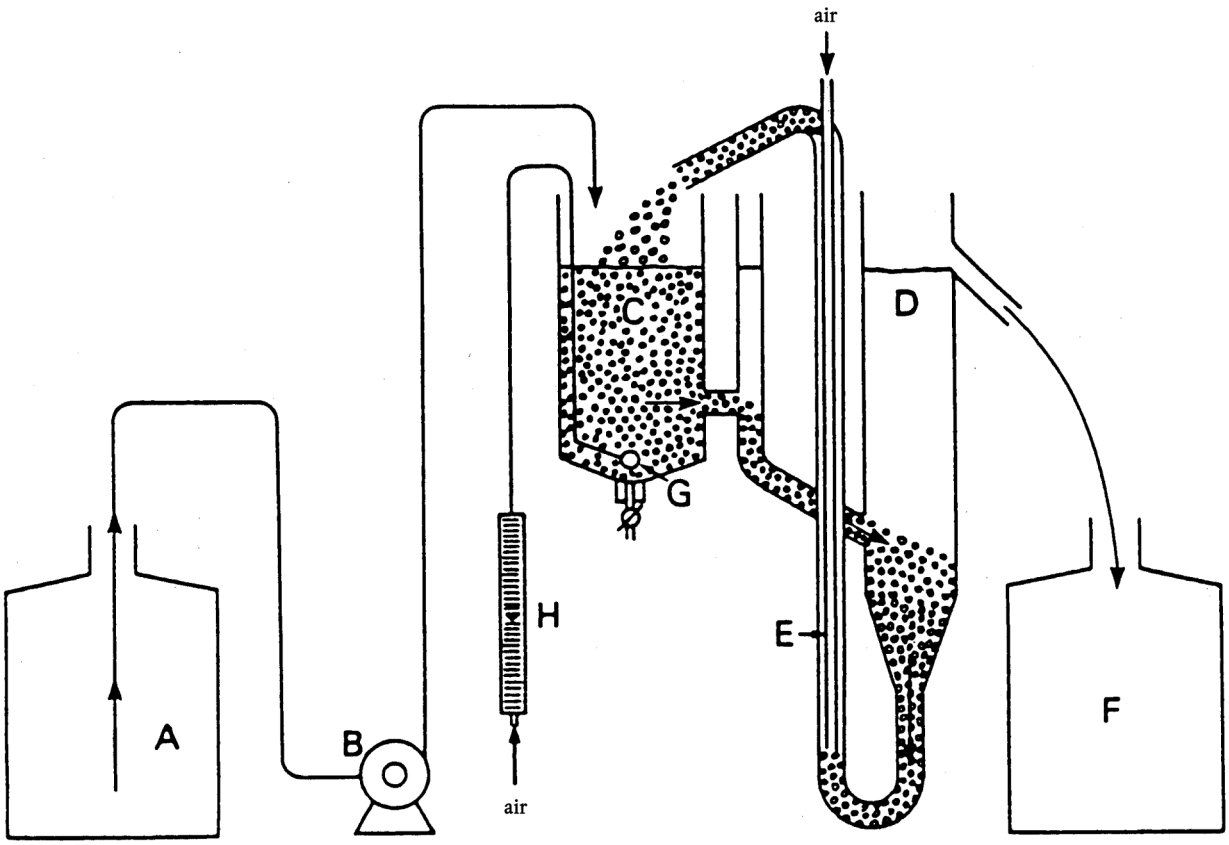
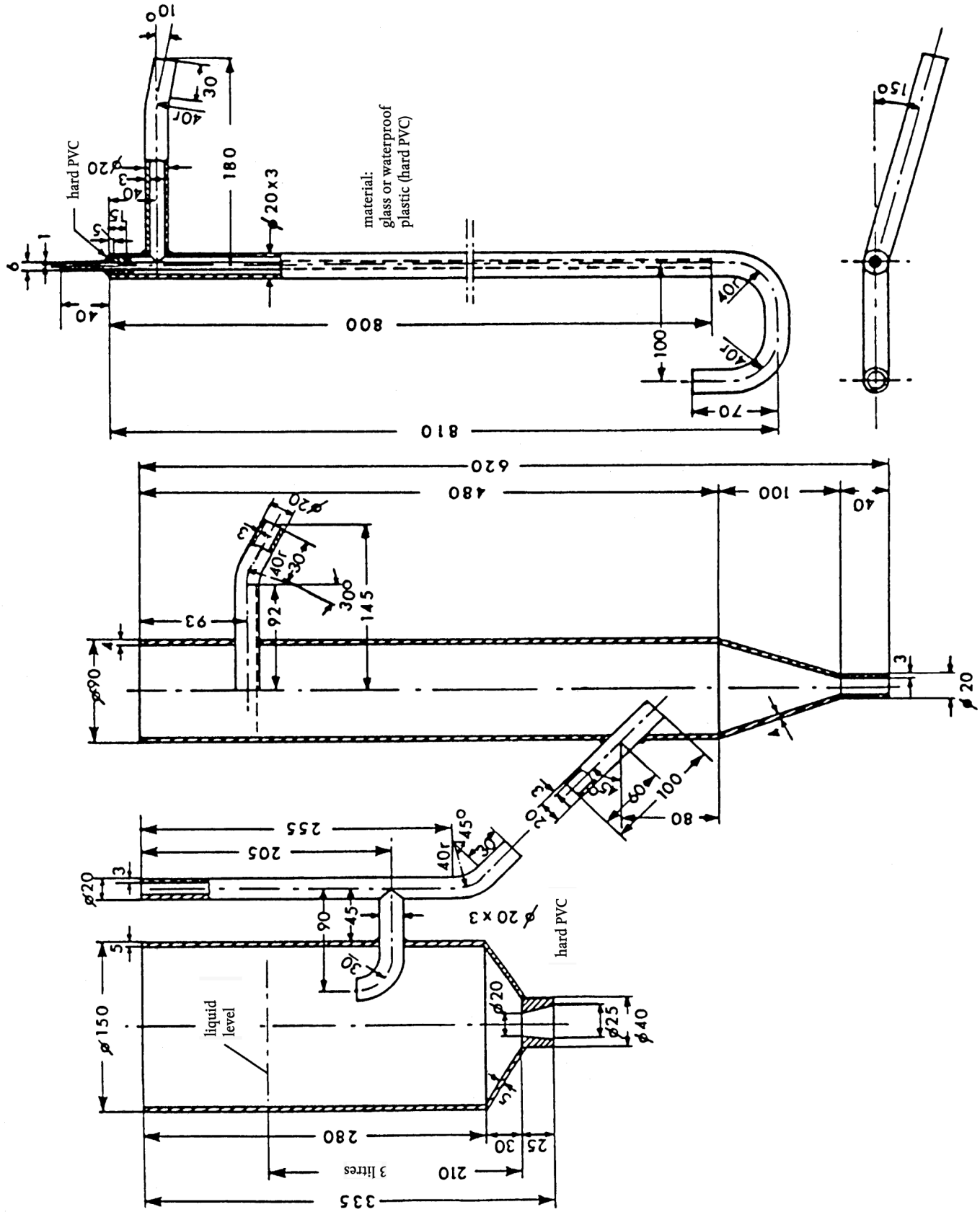


Tabella: A = Kontenituri li jżomm it-taħlita
B = Pompa dożattriċI
C = Kontenitur ta' aerjazzjoni (kappaċità 31)
D = Kontenitur li fih it-taħlita titħalla toqgħod
E = Pompa ta' l-arja
F = Kontenitur li fih jinġabar ir-residwu
G = Pompa aerjattriċi
H = Arloġġ li jaqra l-fluss ta' l-arja (jekk trid)

Tabella 2


material:
glass or waterproof
plastic (hard PVC)
hard PVC
liquid
level
3 litres

Appendiċi 2

Tabella 1

Apparat użat sabiex jistabbilixxi l-biodegrabilità

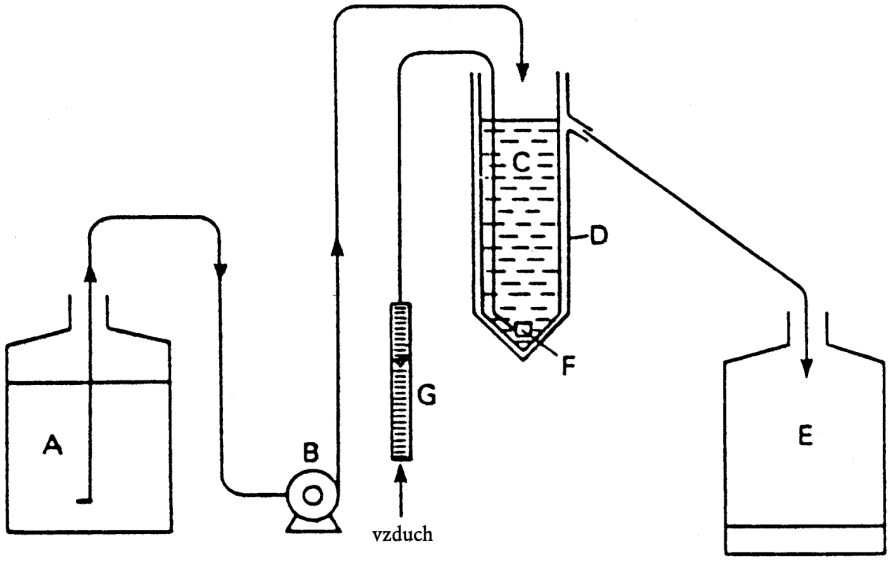
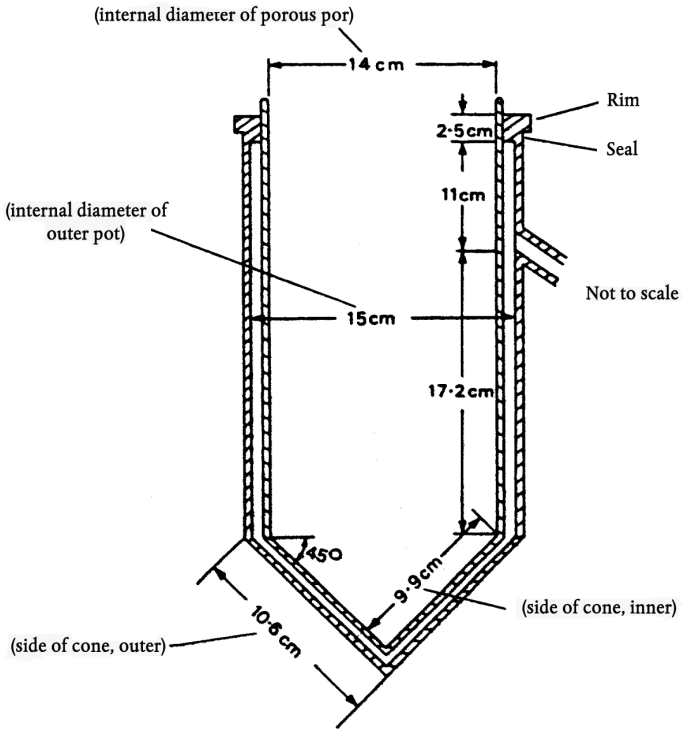


Tabella: A = Kontenituri li jżomm it-taħlita;
B = Pompa dożattriċi;
C = Kontenitur poruż ta' aerjazzjoni;
D = Kontenitur ta' barra impermeabbli;
E = Kontenitur ta' ġbir ta' l-effluwent;
F = Aerjatur b'ġebla li tferrex;
G = Aerjatur b'ġebla li tferrex;

Tabella 2

Dettalji tal-kontenitur poruż ta' aerjazzjoni ta' tlett litri



Appendiċi 3

Thaddim tat-Test ta' Simulazzjoni tat-Tajn Attivat

Immarka kull grupp

Apparat

Konfermatorju OECD ☐

Kontenitur poruż ☐

Mod ta' l-operat

Unità singola ☐

Unitajiet akkoppjati ☐

unitajiet mhux akkoppjati ☐

Transinokulazzjoni

Xejn ☐

Tajn Attivat ☐

Supernatant ☐

Ħin medju taż-żamma

Tlett sieġħat ☐

Sitt sieġħat ☐

Nutrijet Bażi

Drenaġġ Domestiku ☐

Drenaġġ Sintetiku ☐

Inoculum

Effluwent Sekondarju ☐

Kompost ☐

Tajn Attivat ☐

Żieda mal-materjal tat-Test

Mill-bidu ☐

Żieda bil-mod ☐

Wara jkun ifforma t-tajn ☐

Analiżi

Speċifiku ☐

COD ☐

DOC ☐

BIODEGRADAZZJONI

TEST TA' L-INIBIZZJONI TAR-RESPIRAZZJONI TAT-TAJN ATTIVAT

1. METODU

1.1 Introduzzjoni

Il-metodu deskritt jistima l-effett ta' sostanza tat-test fuq il-mikrorganiżmi billi jkejjel ir-rata ta' respirazzjoni f'kondizzjonijiet definiti fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet tas-sostanza tat-test.

L-għan ta' dan il-metodu huwa li jgħati metodu ta' screening li biħ is-sostanzi li jistgħu jaffettwaw ħażin l-impjanti tat-trattament aerobiċi tal-mikrobi jiġu individwati, u li jindika konċentrazzjonijiet xierqa li mhux inibitorji tas-sostanza tat-test li għandha tintuża fit-testijiet tal-biodegrabilità.

Jista' jsir test li jiddefinixxi l-varjetà qabel it-test definittiv. Dan jipprovdi informazzjoni dwar il-varjetà ta' konċentrazzjonijiet li għandhom jintużaw fit-test.

Huma inklużi ukoll żewġ testijiet mingħajr is-sostanza tat-test, wieħed fil-bidu u l-ieħor fl-aħħar tas-serje tat-testijiet. Kull ammont ta' tajn attivat għandu jiġi kkontrollat ukoll bl-użu ta' sostanza ta' referenza.

Dan il-metodu huwa l-aktar applikat għall-sostanzi li, minħabba li dawn jinħallu fl-ilma u li ma evaporawx, x'aktarx li jibqgħu fl-ilma.

Għal sostanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma fis-sostanza tat-test, x'aktarx li ma jkunx possibbli li jiġi ddeterminat l-$EC_{50.}$

Riżultati bbażati fuq il-bżonn ta' ossiġinu jista' jwassal għal konklużjonijiet ħżiena meta s-sostanza tat-test jkolla l-propensità li tneħħi l-fosforilazzjoni ossidattiva akkopjata.

Din l-informazzjoni waqt li jkun qed isir it-test hija bżonnjuża:

— is-solubilità ta' l-ilma

— il-pressjoni tal-fwar

— il-forma strutturali

— il-purità tas-sostanza tat-test.

Rakkomandazzjoni

It-tajn attivat jista' jkollu organiżmi potenzalment patoġeniċi u għandu jiġi mmanovrat b'attenzjoni.

1.2 Definizzjoni u unitajiet

Ir-rata ta' respirazzjoni hija l-konsum ta' ossiġinu tal-mikrorganiżmi fl-ilma maħmuġ f'tajn aerobiku, espressa ġeneralment bħala mgO_2 ta' tajn għal kull siegħa.

Sabiex jiġi kkalkolat l-effett inibitorju tas-sostanza tat-test, f'konċentrazzjoni partikolari, ir-rata ta' respirazzjoni hija espressa bħala perċentwali tal-medja ta' żewġ rati ta' kontroll respiratorju:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{perċentwali ta' inibizzjoni}$$

Fejn:

R_s = rata ta' konsum ta' ossiġinu f'konċentrazzjoni ttestjata ta' sostanza tat-test,

Rc_1 = rata ta' konsum ta' l-ossiġinu, kontroll 1,

Rc_2 = rata ta' konsum ta' l-ossiġinu, kontroll 2.

EC_{50} f'dan il-metodu huwa l-konċentrazzjoni tas-sostanza tat-test li fiha r-rata ta' respirazzjoni hija ta' 50% ta' dik murija mill-kontroll taħt il-kondizzjonijiet deskritti f'dan il-metodu.

1.3 **Sostanzi ta' Referenza**

Huwa rrakkomandat li 3,5-diklorofenol, bħala inibitur magħruf ta' respirazzjoni, jintuża bħala sostanza ta' referenza u ttestjat għall-EC_{50} fuq kull ammont ta' tajn attivat bħala mod ta' kontroll li s-sensitività tat-tajn ma tkunx anormali.

1.4 **Prinċipju tal-metodu tat-test**

Ir-rata ta' respirazzjoni ta' tajn ativat mogħti ammont standard ta' drenaġġ sintetiku huwa mkejjel wara ħin ta' kuntatt ta' 30 minuta jew tlett siegħat, jew it-tnejn li huma. Ir-rata ta' respirazzjoni ta' l-istess tajn attivat fil-preżenza ta' varji konċentrazzjonijiet tas-sostanza tat-test taħt kondizzjonijiet identiċi hija kkalkolata ukoll. L-effett inibitorju tas-sostanza tat-test f'konċentrazzjoni partikolari hija espressa bħala perċentwali tar-rati medji ta' respirazzjoni ta' żewġ kontrolli. Valur EC_{50} huwa kkalkolat mid-determinazzjonijiet ta' konċentrazzjonijiet differenti.

1.5. **Kriterji tal-kwalità**

Ir-riżultati tat-testijiet huma validi jekk:

— iż-żewġ rati ta' kontroll ta' respirazzjoni m'humiex ta' iktar minn 15% minn xulxin,

— l-EC_{50} (30 minuta u/jew tlett siegħat) ta' 3,5-diklorofenol huwa fl-ambitu aċċettat ta' 5 sa 30mg/litru.

1.6. **Deskrizzjoni tal-metodu tat-test**

1.6.1 *Reaġenti*

1.6.1.1. Taħlita tas-sostanza tat-test

Taħlit tas-sostanza tat-test huma ppreparati fil-bidu ta' l-istudju bl-użu ta' taħlita ta' l-istokk. Konċentrazzjoni ta' taħlita ta' l-istokk ta' 0,5 g/litru hija adegwata jekk il-proċedura rrakkomandata hawn isfel hija segwita.

1.6.1.2. Taħlita tas-sostanza ta' kontroll

Taħlita ta' 3,5-diklorofenol tista', per eżempju, tkun ippreparata billi jinħallu 0,5 g 3,5-dikolorofenol f'10 ml ta' 1MnaOH, maħlula f'madwar 30ml ta' ilma distillat, biż-żieda ta' 0,5M H_2SO_4 sal-punt ta' preċipitazzjoni inċipjenti - madwar 8ml ta' 0,5M H_2SO_4 għandu jkun meħtieġ - u fl-aħħar billi t-taħlita tkun maħlula f'litru ta' ilma distillat. Il-pH għandu jkun ta' bejn 7 sa 8.

1.6.1.3. Drenaġġ Sintetiku

Taħlita ta' drenaġġ sintetika issir billi jithalltu flimkien l-ammonti ta' sostanzi li ġejjin f'litru ilma:

— 16g Pepton

— 11 g Estratti mill-laħam

— 3 g Urea

— 0,7 g NaCl

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$

— 2,8 g K_2HPO_4

Nota 1: Dan id-drenaġġ sintetiku huwa 100 darba iktar konċentrat minn dak deskritt fir-Rapport Tekniku OECD "Metodu propost sabiex tiġi stabbilita l-biodegrabilità ta' *surfactants* użati fid-deterġenti sintetiċi (Ġunju 11, 1976), biż-żieda tal-fosfat tad-dipotassju ta' l-idroġenu.

Nota 2: Jekk it-taħlita preparata m'hijiex użata immedjatament, din għandha tinżamm fid-dlam f'temperatura ta' bejn 0° sa 4° C, għal mhux aktar minn ġimgħa, f'kondizzjonijiet li ma jikkawżaw l-ebda biddla fil-komposizzjoni tagħha. It-taħlita tiġi ukoll sterilizzata qabel ma tintrefa, jew il-pepton u l-estratt tal-laħam jista' jiżdied ftit qabel ma jsiru t-testijiet. Qabel l-użu, dan għandu jkun imħallat kompletament u l-pH aġġustat.

1.6.2. *Apparat*

Apparat li jkejjel id-disinn preċiż m'huwiex kritiku. Madankollu, għandu jkun hemm spazju fil-parti l-għolja u l-parti 'l barra għandha teħel tajjeb bl-għonq tal-flixkun tal-kejl.

Apparat nomali tal-laboratorju, u b'mod partikolari dan l-apparat li ġej huwa neċessarju:

— apparat li jkejjel,

— apparat li jippermetti l-aerjazzjoni,

— elettrod li jkejjel il-pH u apparat li jkejjel,

— eletrod ta' l-O_2.

1.6.3. *Preparazzjoni ta' l-inoculum*

It-tajn attivat minn impjant tat-trattament tad-drenaġġ predominament domestiku huwa użat bħala l-*inoculum* micobiku għat-test.

Jekk huwa neċessarju, meta jittieħed lura fil-laboratorju, jistgħu jitenħħew l-biċċiet il-kbar li jkunu qagħdu għal perjodu qasir, e.g. 15-il minuta, u billi jinġibdu biċċiet fini mill-wiċċ ta' l-ilma għall-użu. Alternattivament, it-tajn jista' jkun imħallat bl-użu ta' blender għall-ftit sekondi.

Aktar minn dan, jekk huwa maħsub li jeżisti materjal inibittorju, it-tajn jista' jiġii maħsul bl-ilma tal-vit jew taħlita isotonika. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, is-supernatant huwa ddekantat, (din il-proċedura hija ripetuta għal tlett darbiet)

Ammont żgħir ta' tajn huwa mkejjel mill-piż u mnixxef. Minn dan ir-riżultat, l-ammont ta' tajn mxarrab jista' jiġi kkalkolat li għandu jiġi sospendut fl-ilma sabiex jkun ottenut tajn attivat minn taħlita ta' biċċiet solidi sospiżi ta' bejn 2 u 4 g/litru. Dan il-livell jagħti konċentrazzjoni ta' bejn 0,8 u 1,6 g/litru f'taħlita tat-test jekk il-proċedura rrakkomandata hawn isfel hija segwita.

Jekk it-tajn ma jistgħax jintuża fil-ġurnata ta' meta dan jkun inġabar, 50 ml ta' drenaġġ sintetiku huwa miżjud ma' kull litru ta' tajn attivat li jkun ippreparat kif hawn fuq deskritt; dan għandu imbagħad jiġi aerjat matul il-lejl f'temperatura ta' bejn 20 ± 2° C. Dan jinżamm aerjat għall-użu matul il-jum. Qabel ma jintuża, il-pH għandu jiġi mkejjel u aġġustat, jekk hemm bżonn, għall-pH 6 sa 8. It-taħlita bil-biċċiet sospiżi għandha tiġi ddeterminata kif deskritt fil-paragrafu preċedenti.

Jekk l-istess ammont ta' tajn huwa meħtieġ sabiex jiġi użat fil-ġranet sussegwenti (massimu ta' erbat ijiem), għandu jiżdied 50 ml ta' drenaġġ sintetiku għal kull litru ta' tajn l-aħħar ta' kull ġurnata xogħol.

1.6.4. *Kif għandu jsir it-test*

Ħin li għandu jieħu/ta' kuntatt:	30 minuta u/jew tlett siegħat, li fihom issir l-aerjazzjoni
Ilma:	Ilma tax-xorb (deklorinat jekk meħtieġ)
Fornitura ta' l-arja:	Nadifa, mingħajr żejt. Fluss ta' arja ta' 0,5 sa 1 litru/minuta
Apparat li jkejjel:	Flixkun bil-qieġħ ċatt, bħall-flixkun tat-tip BOD
Arloġġ ta' l-ossiġinu:	Elettrod ta' ossiġinu xieraq, bil-faċilita' li jkejjel
Taħlita ta' nutrijenti:	Drenaġġ sintetiku (ara hawn fuq)
Sostanza tat-test:	Is-sostanza tat-test hija ppreparata fil-bidu tat-test
Sostanza ta' referenza:	e.g. 3,5-diklorofenol (ta' l-anqas tlett konċentrazzjonijiet)
Kontrolli:	Kampjun inokulat mingħajr s-sostanza tat-test
Temperatura:	20 ± 2° C.

Proċedura esperimentali ssuġġerita li tista' tiġi segwita kemm għat-test u kemm għas-sostanza tar-referenza għall-perjodu ta' kuntatt ta' tlett siegħat hija mogħtija hawn isfel:

Ta' l-anqas ħames konċentrazzjonijiet, spazjati b'fattur kostanti preferibbilment li ma taqbiżx 3,2 għadha tkun użata.

Fil-ħin '0', 16 ml tad-drenaġġ sintetiku għandu jsir sa' 300 ml bl-ilma. 200 ml ta' *inoculum* mikrobiku huma miżjuda u t-taħlita totali (500ml) huma mferra' fl-ewwel kontenitur (l-ewwel kontroll C_1).

Il-kontenituri tat-test għandhom jiġu aerjati kontinwament sabiex jassiguraw li l-O_2 maħlul fl-ilma ma jaqgħax taħt 2,3 mg/litru u li, immeddjatament qabel ma tiġI mkejjla r-rata ta' respirazzjoni, il-konċentrazzjoni ta' l-O_2 tkun ta' madwar 6,5 mg/litru.

Wara 15-il minuta' (il-15-il minuta huwa ħin arbitrarju imam konvenjenti bħala interval) dan t'hawn fuq għandu jiġi ripetut, bl-eċċezzjoni li 100 ml tas-sostanza tat-test huma miżjuda mas-16 ml ta' drenaġġ sintetiku u qabel jiżdied l-ilma sa 300 ml u *inoculum* mikobiku sabiex flimkien jagħmlu volum ta' 500 ml. Din it-taħlita hija imbagħad imferra' f'kontenitur ieħor u aerjat kif imsemmi hawn fuq. Dan il-proċess huwa ripetut f'intervalli ta' 15-il minuta b'volumi differenti tas-sostanza tat-test sabiex tagħti serje ta' kontenituri li fihom konċentrazzjonijiet differenti tas-sostanza tat-test. Fl-aħħar, għandi jiġi ppreparat t-tieni kontroll (C_2).

Wara tlett sigħat il-pH huwa mkejjel, u kampjun imħallat sew tal-kontenuti ta' l-ewwel ħames kontenituri huwa mferra' fl-apparat li jkejjel u r-rata ta' respirazzjoni hija mkejjla fuq perjodu sa' 10 minuti.

Din id-determinazzjoni hija ripetuta fuq il-kontenut ta' kull kontenitur f'intervalli ta' 15-il minuta, b'mod li l-ħin tal-kuntatt f'kull kontenitur huwa ta' tlett sigħat.

Is-sostanza ta' referenza huwa ttestjat f'kull kampjun ta' incolumu mikrobiku bl-istess mod.

Reġim differenti (e.g. b'aktar minn arloġġ ta' l-ossiġinu wieħed) huwa neċessarju meta l-kejl għandu jsir wara 30 minuta ta' kuntatt.

Jekk il-kejl ta' l-konsum ta' l-ossiġinu kimikali huwa meħtieġ, konteniturioħrajn huma ppreparati li fihom s-sostanza tat-test, drenaġġ sintetiku u ilma, imma mingħajr tajn attivat.

Il-konsum ta' l-ossiġinu huwa mkejjel u rrekordjat wara perjodu ta' aerjazzjoni ta' 30 minuta u/jew tlett sigħat (ħin ta' kuntatt).

2. DATA U VALUTAZZJONI

Ir-rata ta' respirazzjoni hija kkalkolata mit-traċċi rrekordjati bejn madwar 6,5 mg O_2/litru u 2,5 mg O_2/litru, jew fuq perjodu ta' 10 minuti meta r-rata ta' respirazzjoni tkun waħda baxxa. Il-porzjon tal-kurva tar-respirazzjoni li fuqha hija mkejjla r-rata ta' respirazzjoni għandha tkun lineari.

Jekk ir-rati ta' respirazzjoni taż-żewġ kontrolli m'humiex fi 15% 'l bogħod minn xulxin, jew l-EC_{50} (30 minuta u/jew tlett sigħat) tas-sostanza ta' referenza ma tkunx f'mejda aċċettata (5 sa 30 mg/litru għal 3,5 diklorofenol), it-test huwa invalidu u għandu jerġa' jsir.

Il-perċentwali ta' l-inibizzjoni hija kkalkolata fuq kull test ta' konċentrazzjoni (ara 1.2.). Il-perċentwal ta' l-inibizzjoni hija mpinġijja mal-konċentrazzjoni fuq karta *log-normal* (jew *log-probability*), u b'hekk għandu jkun ottenut valur EC_{50}.

Limiti ta' konfidenza ta' 95% għall-valuri EC_{50} jistgħu jkunu stabbiliti mill-proċeduri standard.

3. RAPPURTAĠĠ

3.1. Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, sa fejn hu possibbli, dan li ġej:

— is-sostanza tat-test: data li tidentifika l-kemikali

— is-sistema tat-test: s-sors, konċentrazzjoni u kwalunkwe pre-trattament tat-tajn ativat,

— kondizzjonijiet tat-test:

  — pH tar-reazzjoni tat-taħlita qabel ma tiġi mkejjla r-respirazzjoni,

  — it-temperatura tat-test,

  — id-dewmien tat-test

  — is-sostanza ta' referenza u l-EC_{50} tagħha mkejjel,

  — il-bżonn ta' l-ossiġinu abijotiku (jekk hemm).

— riżultati:

  — d-data kollha mkejjla

  — il-kurva ta' l-inibizzjoni u l-metodu għall-kalkolazzjoni ta' l-EC_{50},

  — l-EC_{50} u, jekk possibbli, l-limiti ta' konfidenza ta' 95%, EC_{20} u EC_{30}

  — l-osservazzjonijiet kollha u kwalunkwe derivazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar u li seta' influenza r-riżultat.

3.2. Interpretazzjoni tad-data

Il-valur EC_{50} għandu jiġi meqjus bħala gwida għat-tossiċita probabbli tas-sostanza tat-test għat-trattament tajn attivat tad-drenaġġ jew għall-mikrorganiżmi ta' l-ilma tar-rimi, minħabba li l-interazzjonijiet kumplessi li jseħħu fl-ambjent ma jistgħux ikunu akkuratament simulati t-testijiet tal-laboratorju. Aktar minn dan, is-sostanzi tat-test li jista' jkollhom effett inibitorju fuq l-ossidazzjoni ta' l-ammonja jistgħu jipproduċu wkoll kurvi atipikali ta' inibizzjoni. B'hekk, dawn il-kurvi għandhom jiġu interpretati b'attenzjoni.

4. **REFERENZI**

1) Standard Internazzjonali ISO 8192-1986.

2) Broecker, B., Zahn, R., *r-Riċerka dwar l-ilma* 11, 1977, p. 165.

3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, *L., Kemosfera* 10, 1981, p. 245.

4) ETAD (Assoċċjazzjoni Ekoloġika u Tossolġika ta' l-Industrija tal-Prodotti li Jagħtu l-Kulur), *Metodu Rrakkomandat Nru. 103*, deskritt ukoll minn:

5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.

6) Schefer, W., *Textilveredlung 6,* 1977, p. 247.

7) OECD, Paris, 1981, Gwida tat-Test *209*, Deċiżjoni tal-Kunsill nru. C(81) 30 finali.

BIODEGRADAZZJONI

TEST SCAS MODIFIKAT

1. **METODU**

1.1. **Introduzzjoni**

L-għan tal-metodu huwa l-valutazzjoni tal-biodegrabilità aħħarija potenzali tas-sostanzi organiċi li jinħallu fl-ilma u li ma jinxfux malajr meta esposti għall-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin ta' mikrorganiżmi fuq perjodu ta' żmien twil. Il-vijabbilità tal-mikrorganiżmi hija mantenuta fuq dan il-perjodu biż-żieda ta' kuljum ta' dħul ta' drenaġġ. (Għar-rekwiżiti fi tmiem il-ġimgħa, id-drenaġġ jista' jinżamm f'temperatura ta' 4° C. Alternattivament, id-drenaġġ sintetiku tat-test konfermatorju OECD jista' jintuża.)

L-assorbiment fiżiko-kemikali tal-biċċiet sospiżi jista' jseħħ, u dan għandu jitqies meta jiġu interpretati r-riżultati (ara 3.2.).

Minħabba l-perjodu twil ta' detenzjoni tal-faži likwida (36 siegħa), u ż-żieda intermittenti tan-nutrijenti, t-test ma jistimulax il-kondizzjonijeit esperjenzati fl-impjant tat-trattament tad-drenaġġ. Ir-riżultati miksuba mill-varji sostanzi tat-test jindikaw li t-test għandu potenzal għoli ta' biodegradazzjoni.

Il-kondizzjonijiet provduti mit-test huma favorevoli ħafna għall-għażla u/jew l-adattazzjoni ta' mikrorganiżmi kapaċi jiddegradaw il-kompost tat-test. (Il-proċedura tista' tkun użata wkoll sabiex tipproduċi *inocula* akklimatizzati għall-użu tagħhom f'testijiet oħrajn.)

F'dan il-metodu, l-kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbon organiku maħlul huwa użat sabiex jistima l-biodegrabilità aħħarija tas-sostanzi tat-test. Huwa preferibbli li jiġi ddeterminat id-DOC wara l-aċidifikazzjoni u l-tindif milli bħala d-differenza C_{totali} - $C_{inorganika}$

L-użu simultaneju ta' metodu speċifiku analitiku jista' jippermetti l-istima tad-degradazzjoni primarja tas-sostanza (ma jibqax tidher l-istruttura tal-kimika oriġinali).

Il-metodu huwa applikabbli biss għall-dawk is-sostanzi organiċi tat-test li, bil-konċentrazzjoni użata fit-test:

— jinħallu fl-ilma (ta' l-anqas 20mg organiku maħlul karbon/litru),

— għandhom pressjoni ta' l-istijm negliġibbli,

— m'humiex inibittorji għall-batteri,

— m'humiex assobiti b'mod sinifikattiv fis-sistema tat-test,

— m'humiex mitlufa b'fowming mit-taħlita tat-test.

Il-kontentut tal-karbon organiku tal-materjal tat-test għandu jiġi stabbilit.

Informazzjoni fuq il-porzjonijiet relattivi tal-komponenti l-maġġuri tal-materjal tat-test tkun bżonnjuża sabiex jiġu interpretati r-riżultati miksuba, partikolarment f'dawk il-każijiet fejn ir-riżultati huma baxxi jew marġinali.

Informazzjoni fuq it-tossiċità għall-mikrorganiżmi tas-sostanza tista' tkun bżonnjuża sabiex tinterpreta r-riżultati baxxi u fl-għażla ta' konċentrazzjoni xierqa tat-test.

1.2. **Definizzjonjiet u unitajiet**

C_T = konċentrazzjoni tal-kompost tat-test bħala karbon organiku kif jinstab jew miżjud mad-drenaġġ li jkun qagħad fil-bidu tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru),

C_t = konċentrazzjoni ta' karbon organiku maħlul li jinstab fit-taħlita supernatanta tat-test fit-tmien tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru),

C_c = konċentrazzjoni ta' karbon organiku maħlul li jinstab fit-taħlita supernatanta tal-kontroll fit-tmien tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru).

Il-biodegradazzjoni hija definita b'dan il-metodu bħala l-iskopariment tal-karbon organiku. Il-biodegradazzjoni tista' tiġi espressa bħala:

1. Il-perċentwal tat-tneħħija ta' D_{da} ta' l-ammont tas-sostanza miżjuda kuljum:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

fejn

D_{da} = degradazzjoni/żieda ta' kuljum.

2. Il-perċentwali tat-tneħħija D_{ssd} ta' l-ammont tas-sostanza fil-bidu ta' kull jum:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t\ (i+1)} + 3C_{c\ (i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2\ (b)]$$

fejn

D_{ssd} = degradazzjoni/bidu ta' sostanza tal-ġurnata;

l-indiċi i u (i + 1) jirreferu għall-ġurnata li fiha sar il-kejl.

Il-formula 2(a) hija rrakkomandata jekk l-effluwent DOC ivarja minn jum għal jum, filwaqt li l-formula 2(b) tista' tkun użata meta l-effluwent DOC jibqa' relattivament kostanti minn ġurnata għall-oħra.

1.3. **Sostanzi ta' referenza**

F'ċerti każijiet, meta xi sostanza ġdida tkun qed tiġi investigata, s-sostanzi ta' referenza jistgħu jkunu ta' benefiċċju, pero', m'hi rakkomandata l-ebda sostanza ta' referenza hawnhekk.

Id-data fuq bosta komposti evalwati fit-testijiet ring huma provduti (ara l-Appendiċi 1) primarjament sabiex il-kalibrazzjoni tal-metodu tkun tista' ssir minn żmien għall-ieħor u sabiex tippermetti tqabbil tar-riżultati meta jkun applikat metodu ieħor.

1.4. **Metodu prinċipali tat-test**

Tajn attivat minn impjant tat-trattament tad-drenaġġ huwa mpoġġi f'unità ta' tajn attivat semi-kontinwu (SCAS). Il-kompost tat-test u d-drenaġġ li jkun qagħad huma miżjuda, u t-taħlita hija aerjata għall-23 siegħa. L-aerjazzjoni hija imbagħad imwaqqfa, it-tajn joqgħod u t-taħlita supernatanta hija mneħħija.

It-tajn li jkun baqa' fil-kontenitur ta' aerjazzjoni huwa imbagħad imħallat ma' alikwot ieħor tal-kompost tat-test u d-drenaġġ, u ċ-ċiklu huwa imbagħad ripetut.

Il-biodegradazzjoni hija stabbilita bid-determinazzjoni tal-kontenut tal-karbon organiku maħlul fit-taħlita supernatanta. Il-valur huwa imbagħad imqabbel ma dak misjub għat-taħlita miksuba mit-tubu ta' kontroll bid-doża tad-drenaġġ li qagħad.

Meta huwa użat metodu speċifiku analitiku, t-tibdil fil-konċentrazzjoni tal-molekula oriġinali minħabba l-biodegradazzjoni tista' tiġi mkejjla (biodegrabilità primarja).

1.5. **Kriterji tal-kwalità**

Ir-reproduċibilità ta' dan il-metodu bbażata fuq it-tneħħija tal-karbon organiku maħlul għada ma ġietx stabilita. (Meta tiġi kkonsidrata l-biodegradazzjoni primarja, hija miksuba data preċiża ħafna għall-materjali li huma degradati estensivament.)

Is-sensittività tal-metodu hija ddeterminata ħafna mill-varjabbilità tal-*blank* u, xi ftit inqas, mill-preċiżjoni tad-determinazzjoni tal-karbon organiku maħlul u l-livell tal-kompost tat-test fit-taħlita fil-bidu ta' kull ċiklu.

1.6. **Deskrizzjoni tal-proċedra tat-test**

1.6.1. *Preparazzjonijiet*

Nurmu suffiċjenti ta' unitajiet ta' aerjazzjoni nodfa, tista' tiġi użata. l-unità SCAS ta' 1,5 litru oriġinali u tubi li jdaħħlu l-arja (Figura 1) għall-kull sostanza tat-test u l-kontrolli huma mibnijin. Arja kkompressata fornita lill-unitajiet tat-test, mnaddfa b'tajjara, għandhom ikunu nodfa mill-karbon organiku u pre-saturati bl-ilma sabiex jiġu mnaqqas t-telf minħabba l-evaporazzjoni.

Kampjun ta' taħlita, li fiha 1 sa 4 gr solidi/litru sospensjoni, hija miksuba mill-impjant tat-tajn attivat li jitratta predominament d-drenaġġ domestiku. Madwar 150 ml tat-taħlita huma meħtieġa għall-kull unità ta' aerjazzjoni.

Taħlit ta' l-istokk tas-sostanza tat-test hija ppreparata fl-ilma distillate; il-konċentrazzjoni normalment meħtieġa hija ta' 400 mg/litru bħala karbon organiku li tagħti konċentrazzjoni tal-kompost tat-test ta' 20 mg/litru fil-bidu ta' kull ċiklu ta' aerjazzjoni jekk ma sseħħ l-ebda biodegradazzjoni.

Konċentrazzjonijiet ogħla huma permessi jekk it-tossiċità tal-mikroganiżmi tippermettiha.

Il-kontenut tal-karbon organiku tat-taħlita ta' l-istokk hija mkejjla.

1.6.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

It-test għandu jsir f'temperatura ta' bejn 20 sa 25°C.

Għandha tintuża konċentrazzjoni għolja tal-mikorganiżmi (minn 1 sa 4 g/litru ta' solidi sospiżi), u l-perjodu effettiv ta'detenzjoni huwa ta' 36 siegħa. Il-materjal karbonaċeju fid-drenaġġ huwa estensivament ossidizzat, normalment fi tmien siegħat wara li jkun inbeda ċ-ċiklu ta' aerjazzjoni. Wara dan, it-tajn jirrespira endoġenament għall-bqijja tal-perjodu ta' aerjazzjoni, waqt dan il-perjodu l-uniku sostratt għad-disposizzjoni huwa l-kompost tat-test sakemm dan ma jkunx diġa metabolizzat. Dawn il-fatturi, kkombinati mar-reinokulazzjoni ta' kuljum tat-test meta d-drenaġġ domestiku huwa użat bħala l-materjal, jagħti kondizzjonijiet favorevoli kemm għall-akklimatizzazzjoni u l-livelli għoljin ta' biodegradazzjoni.

1.6.3. *Kif isir it-test*

Kampjun ta' taħlita minn impjant xieraq li jittratta predominalment tajn attivat jew unità tal-laboratorju huwa miksub u miżmum aerobiku sakemm dan ikun użat fil-laboratorju. Kull unità ta' aerjazzjoni kif ukoll l-unità ta' kontroll huma mimlijin b' 150ml tat-taħlita (jekk l-unita' oriġinali SCAS hija użata, immoltiplika l-volumi mogħtija b' 10 darbiet) u l-aerjazzjoni b'hekk tkun bdiet. Wara 23 siegħa, l-aerjazzjoni hija mwaqqfa u t-tajn jitħalla joqgħod għall-45 minuta. It-tapp ta' kull kontenitur jinfetaħ, u għandhom jittieħdu porzjonijiet ta' 100 ml tat-taħlita supernatanta. Kampjun ta' drenaġġ domestiku huma miksuba immedjatament qabel l-użu, u 100 ml għandhom jiġu miżjuda mat-tajn rimanenti f'kull unità ta' aerjazzjoni. L-aerjazzjoni għandha terġa tinbeda. F'dan l-istadju m'għandhom jiġu miżjuda l-ebda materjali tat-test, u l-unitajiet huma mitmuma kuljum bid-drenaġġ domestiku biss sakemm it-taħlita supernatanta hija miksuba wara li jkun tħalla jitqiegħed. Dan normalment jieħu sa ġimgħatejn, li sa dak iż-żmien il-karbon organiku maħlul fit-taħlita supernatanta fl-aħħar taċ-ċiklu ta' aerjazzjoni twassal għal valur kostanti.

Fit-tmiem ta' dan il-perjodu, it-tajn individwali li jkun qagħad huma mħallta, u għandu jiżdied 50 ml tat-tajn kompost li jirriżulta ma kull unità.

95 ml tad-drenaġġ li jirriżulta u 5 ml ta' ilma huma miżjuda ma' l-unitajiet ta' kontroll, u 95 ml tad-drenaġġ trattat u 5 ml tal-kompost xieraq tat-taħlita ta' l-istokk (400 mg/litru) huma miżjuda ma' l-unitajiet tat-test. L-aerjazzjoni għandha terġa tinbeda u tkompli għal 23 siegħa. It-Tajn imbagħad għandu jitħalla joqgħod għal 45 minuta u s-supernatant jittieħed u annalizzat għall-kontenut ta' karbon organiku.

Il-proċedura ta' mili u tneħħija hija ripetuta regoalrment kuljum.

Qabel ma jitħalla joqgħod, jaf ikun neċessarju li l-unitajiet jinaddfu sabiex jipprevjenu l-akkumulazzjoni ta' solidi 'l fuq mil-livell tal-likwidu. Barraxa differenti għandha tintuża għal kull unità sabiex tiġi evitat l-kontaminazzjoni.

Idejalment, il-karbonju organiku maħlul fit-taħlita supernatanta hija determinata kuljum, għalkemm analiżi inqas frekwenti tista' ssir ukoll. Qabel l-analiżi, it-taħlit huma ffiltrati permezz ta' filtri tal-membrena maħsula ta' 0,45 μm jew ċċentrifugati. Il-filtri tal-membrena huma xierqa jekk huwa assigurat li dawn ma jirrilaxxawx il-karbonju jew li ma jixprbux is-sostanza fil-fażi tal-filtrazzjoni. It-temperatura tal-kampjun ma tistgħax taqbeż l-40 °C waqt li tkun qegħdha fiċ-ċentrifugu.

It-tul tat-test tal-komposti li juru ftit jew xejn biodegradazzjoni hija indeterminata, imma l-esperjenza tissuġġerixxi li din għandha tkun ta' l-anqas ta' 12-il ġimgħa, imma ta' mhux aktar minn 26 ġimgħa.

2. DATA U VALUTAZZJONI

Il-valuri tal-karbon organiku maħlul fit-taħlit supernatant ta' l-unitajiet tat-test u l-unitajiet ta' kontrol huma mpinġija mal-ħin.

Kif tkun qed iseħħ il-biodegradazzjoni, il-livell misjub fit-test għandu jersaq lejn misjub għall-kontroll. La darba d-differenza bejn iż-żewġ livelli hija misjuba bħala waħda kostanti fuq it-tlett kejliet konsekutivi, in-numru meħtieġ ta' iktar kejl kif hemm bżonn sabiex ikun jista' jsir trattament statistikali tad-data u l-perċentwali tal-biodegradazzjoni tal-kompost tat-test huwa kkalkolat (D_{da} jew D_{ssd}, ara 1.2).

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. **Rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jkollu dan li ġej:

— l-informazzjoni kollha fuq it-tip ta' drenaġġ, t-tip ta' unitajiet użati u r-riżultati esperimentali dwar is-sostanza ttestjata, is-sostanza ta' referenza jekk użata, u l-*blank*,

— it-temperatura,

— il-kurva ta-tneħħija bid-deskrizzjoni, mod ta' kalkolazzjoni (ara 1.2.),

— d-data u l-lokazzjoni fejn, ittieħed il-kampjun tat-tajn attivat u d-drenaġġ, status ta' adattazzjoni, konċentrazzjoni, etc..,

— raġunijiet xjentifiċi għall-xi tibdil fil-proċedura tat-test,

— firma u data.

3.2. **Interpretazzjoni tar-riżultati**

Minħabba li s-sostanza li għandha tiġi ttestjata b'dan il-metodu mhux ser tkun biodegradabbli minn qabel, kwalunkwe tneħħija ta' DOC minħabba l-biodegradazzjoni għandha tkun normalment gradwali fuq xi jiem jew ġimgħat, ħlief f'każijiet fejn l-akklimatizazzjoni seħħ malajr kif indikat minn skompariment f'daqqa waħda li jseħħ wara ftit ġimgħat.

Madankollu, l-assorbiment fiżiko-kemikali jista' xi kultant jkollu rwol importanti; dan huwa indikat meta jkun hemm tneħħija kompleta jew parzjali tad-DOC miżjud. Dak kollu li jiġri sussegwentement jiddependi minn fatturi bħall-gradi ta' assorbiment u l-konċentrazzjoni ta' biċċiet sospiżi fl-effluwenti mormi. Ġeneralment id-differenza bejn il-konċentrazzjoni ta' DOC fil-kontroll u t-test tat-taħlit supernatant jiżdied bil-mod minn valur inizjali baxx u din id-differenza tibqa' fil-valur ġdid għall-bqija ta' l-esperiment, sakemm ma sseħħxl-akklimatizazzjoni.

Jekk għandha ssir distinzjoni bejn il-biodegradazzjoni (jew biodegradazzjoni parzjali) u l-assorbiment, huma neċessarji li jsiru aktar testijiet. Dan jista' jseħħ f'numru ta' modi, imma l-iktar wieħed konvinċenti huwa l-użu ta' taħlita supernatanta, jew tajn, bħala inoculum f'test bażi (preferibbilment test resiromatiku).

Is-sostanzi tat-test li jagħtu rimi mhux assobiv għoli ta' DOC għandhom jitqiesu bħala potenzalment biodegradabbli. Rimi parzjali, mhux assorbiv jindika li ta' l-anqas il-kemikali huwa soġġett għal xi biodegradazzjoni.

Rimi baxx, jew xejn, ta' DOC jista' jseħħ minħabba l-inibizzjoni ta' mikrorganiżmi mis-sostanza tat-test u dan jista' jidher ukoll mill-leża u t-telf tat-tajn, bir-rimi ta' supernatanti turbidi. Dan it-test għandu jiġI ripetut bl-użu ta' konċentrazzjoni iktar baxxa tas-sostanza tat-test.

L-użu tal-metodu analitiku speċifiku jew ta' ^{14}C-*labelled* sostanza tat-test tista' tippermetti aktar sensittività. Fil-każ ta' compost tat-test ^{14}C, ir-rekupru tal-$^{14}CO_2$ għandu jikkonferma li l-biodegradazzjoni tkun seħħet.

Meta jingħataw ukoll ir-riżultati f'termini ta; biodegradazzjoni primarja, għandha tingħata, sa fejn hu possibbli, spjegazzjoni dwar it-tibdil fl-istruttura kemikali li twassal għat-telf tar-ripons mis-sostanza oriġinali tat-test.

Il-validazzjoni tal-metodu analitiku għandha tingħata flimkien mar-rispons li jisntab mill-materja tat-test *blank*.

4, **REFERENZI**

(1) OECD, PariġI, 1981, *Linji Gwida għat-Testijet, 302 A*, Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali.

Appendiċi 1

Test SCAS: eżempju tar-riżultati

Sostanza	C_T (mg/l)	$C_i - C_c$ (mg/l)	Perċentwali tal-biodegradazzjoni D_{da}	Dewmien tat-Test (ġranet)
4-acetyl sulfonat tal-aminobenzene	17,2	2,0	85	40
Sulfonat tat-tetra propylene benzene	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylene tal-glikol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentane tetra Karbossilat	17,9	3,2	81,1	120

Appendiċi 2

Eżempju ta' l-apparatus tat-test

Figura 1

