Dan id-dokument ġie magħmul bil-ħsieb li jintuża bħala għodda ta' dokumentazzjoni u l-istituzzjonijiet ma jassumu l-ebda responsabbiltà għall-kontenut tiegħu

►**B** **REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 440/2008**

tat-30 ta' Mejju 2008

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

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

(ĠU L 142, 31.5.2008, p. 1)

Emendat minn:

		Ġurnal Uffiċjali		
		Nru	Paġna	Data
►**M1**	Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 761/2009 tat-23 ta' Lulju 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 1152/2010 tat-8 ta' Diċembru 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 640/2012 tas-6 ta' Lulju 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Regolament tal-Kummissjoni (UE) Nru 260/2014 tal-24 ta' Jannar 2014	L 81	1	19.3.2014

▼B

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 440/2008

tat-30 ta' Mejju 2008

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

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

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

Wara li kkunsidrat ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament tal-Kunsill (KEE) Nru 793/93 u r-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1488/94 kif ukoll id-Direttiva tal-Kunsill 76/769/KEE u d-Direttivi tal-Kummissjoni 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE [1], u b'mod partikolari l-Artikolu 13(3) tiegħu,

Billi:

(1) Skond ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006, metodi ta' ttestjar għandhom jiġu adottati fuq il-livell tal-Komunità għall-finijiet ta' testijiet fuq sustanzi fejn tali testijiet huma meħtieġa biex jiġġeneraw l-informazzjoni dwar il-karatteristiċi intrinsiċi ta' sustanzi.

(2) Id-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE tas-27 ta' Ġunju 1967 rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikolużi [2] stipulat, fl-Anness V, metodi għad-determinazzjoni tal-proprjetajiet fiżikokimiċi, it-tossiċità u l-ekotossiċità ta' sustanzi u preparati. L-Anness V għad-Direttiva 67/548/KEE tħassret bid-Direttiva 2006/121/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill, b'effett mill-1 ta' Ġunju 2008.

(3) Il-metodi ta' ttestjar li hemm fl-Anness V għad-Direttiva 67/548/-KEE għandhom jiġu inkorporati f'dan ir-Regolament.

(4) Dan ir-Regolament ma jeskludix l-użu ta' metodi oħra ta' l-ittestjar, sakemm l-użu tagħhom ikun kompatibbli ma' l-Artikolu 13(3) tar-Regolament 1907/2006.

---

[1] ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1. kif ikkoreġut bil-ĠU L 136, 29.5.2007, p. 3.

[2] ĠU 196, 16.8.1967, p. 1. Id-Direttiva kif emendata l-aħħar bid-Direttiva 2006/121/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill (ĠU L 396, 30.12.2006, p. 850) – *għandha tiġi aġġornata bir-referenzi rilevanti mal-pubblikazzjoni tat-30 ATP.*

▼B

(5) Il-prinċipji tas-sostituzzjoni, it-tnaqqis u l-irfinar ta' l-użu ta' l-annimali fi proċeduri għandhom jiġu kkunsidrati bis-sħiħ fid-disinn tal-metodi ta' ttestjar, partikolarment meta metodi f'lokhom u validati jsiru disponibbli biex jissostitwixxu, inaqqsu jew jirfinaw l-ittestjar fuq l-annimali.

(6) Id-dispożizzjonijiet ta' dan ir-Regolament huma konformi ma' l-opinjoni tal-Kumitat stabbilit skond l-Artikolu 133 tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006,

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

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

Artikolu 2

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

Artikolu 3

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

Artikolu 4

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

Għandu japplika mill-1 ta' Ġunju 2008.

▼B

ANNESS

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

WERREJ

A.1. TEMPERATURA TA' TIDWIB/IFFRIŻAR

A.2. TEMPERATURA TAT-TGĦOLIJA

A.3 DENSITÀ RELATTIVA

A.4. PRESSJONI TA' FWAR

A.5. TENSJONI TAS-SUPERFIĊJE

A.6. SOLUBILITÀ FL-ILMA

A.8. KOEFFIĊJENT TAL-QSIM

A.9. IL-PUNT TA' fjammabilità

A.10. FJAMMABILITÀ (SOLIDI)

A.11. FJAMMABILITÀ (GASSIJIET)

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

A.13. PROPRJETAJIET PIROFORIĊI TA' SOLIDI U LIKWIDI

A.14. PROPRJETAJIET ESPLOŻIVI

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

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

A.17. PROPRJETAJIET OSSIDANTI (SOLIDI)

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

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

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

A.21. PROPRJETAJIET OSSIDIZZANTI (LIKWIDI)

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

▼M4

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

▼B

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

1. **METODU**

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

1.1. DAĦLA

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

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

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

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

$t = T - 273,15$

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

T: temperatura termodinamika, kelvin (K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

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

▼B

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

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

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

1.4.1. **Metodu kapillari**

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

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

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

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

1.4.1.3. *Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula*

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

1.4.2. **Uċuh ta' Sħana**

1.4.2.1. *Il-bank sħun Kofler*

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

▼B

1.4.2.2. *Mikroskopju tat-tidwib*

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

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

1.4.2.3. *Metodu tal-menisku*

Dan il-metodu jintuża b'mod speċifiku għal poliamidi

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

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

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

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

1.4.4. **Analiżi termika**

1.4.4.1 *Analiżi termika differenzjali (ATD)*

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

▼B

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

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

1.4.5. **Punt ta' tferriegħ**

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

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

TABELLA: APPLIKABILITÀ TAL-METODI

A. **Metodi kapillari**

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

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

▼B

B. **Uċuh sħan u metodi ta' ffriżar**

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

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

C. **Analiżi termika**

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

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

D. **Punt ta' tferrigħ**

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

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

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

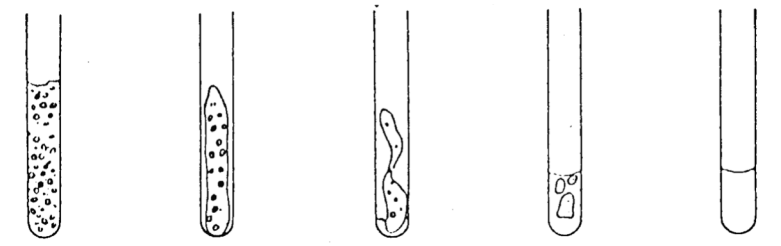
Il-proċeduri għal kważi l-metodi ta' ttestjar kollha tfissru fi standards internazzjonali u nazzjonali (Ara Appendiċi 1)

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

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

▼B

Figura 1



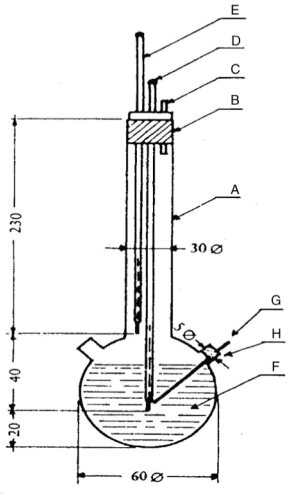
Stadju A	(Bidu tat-tidwib): Qtar żgħar jeħlu b'mod uniformi ma' ġewwa tat-tubu kapillari
Stadju B	jidher spazju vojt bejn il-kampjun u l-ġewwa tat-tubu minħabba li t-tidwiba tiċkien
Stadju C	il-kampjun mċekken jibda jikkollassa 'l isfel u jillikwifa ruħu
Stadju D	menisku komplet jiġi ffurmat fil-wiċċ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

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

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

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

Figura 2



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

▼B

Banju ta' likwidu:

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

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

Termometru:

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

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

Proċedura:

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

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

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

Kalkolu:

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

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

fejn:

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

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

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

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

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

Apparat:

Dan jikkonsist fi:

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

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

▼B

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

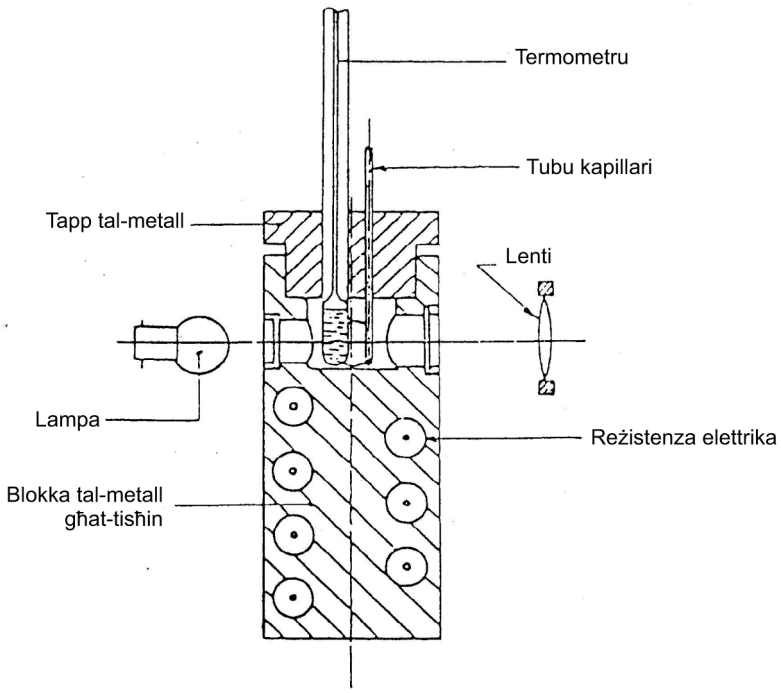
— reostat għar-regolazzjoni tal-qawwa applikata, jekk jintuża tisħin elettriku.

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

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

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

Figura 3



1.6.1.3. *Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula*

Apparat u proċedura:

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

▼B

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

1.6.2. **Uċuh sħan**

1.6.2.1. *Il-bank sħun Kofler*

Ara l-Appendiċi

1.6.2.2. *Mikroskopju tat-tidwib*

Ara l-Appendiċi

1.6.2.3. *Metodu tal-menisku (poliamidi)*

Ara l-Appendiċi

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

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

Ara l-Appendiċi

1.6.4. **Analiżi termika**

1.6.4.1. *Analiżi termika differenzjali*

Ara l-Appendiċi

1.6.4.2. *Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar*

Ara l-Appendiċi

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

Ara l-Appendiċi

2. **DATA**

Korrezzjoni tat-termometru hija neċessarja f' xi każijiet.

3. **RAPPURTAR**

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

— metodu użat

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

— kalkolu ta' l-eżattezza

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

▼B

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

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

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

4. **REFERENZI**

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

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

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

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

▼B

Appendiċi

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

1. **Metodi kapillari**

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

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

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

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

2. **Elementi Imsaħħnin**

2.1. Il-bank sħun Kofler

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

2.2. Mikroskopju tat-tidwib

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Metodu tal-menisku (poliamidi)

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

▼B

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

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

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

4. **Analiżi termika**

4.1. Analiżi termika differenzjali

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

▼B

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

4.2. Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar

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

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

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

▼B

A.2. TEMPERATURA TAT-TGĦOLIJA

1. METODU

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

1.1. DAĦLA

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

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

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

Rimarki:

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

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

fejn:

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

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

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

T = it-temperatura termodinamika, f' K

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

▼B

Bdil

Pressjoni (unitajiet: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(“bar” għadha permessa iżda mhux rakkomandata)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

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

1 atm = atmosfera standard = 101 325 Pa

(l-unità “atm” mhix permessa).

Temperatura (unitajiet: K)

t = T - 273,15 K

t: temperatura Celsius, grad Celsius (°C)

T: temperatura termodinamika, kelvin (K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

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

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-ITTESTJAR

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

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

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

1.4.2. **Metodu dinamiku**

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

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

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

▼B

1.4.4. **Metodu skond Siwoloboff**

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

1.4.5. **Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula**

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

1.4.6. **Analiżi termika differenzjali**

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

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

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

Tabella 1

Paragun tal-metodi

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

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

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

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

1.6.1. **L-ebulliometer**

Ara l-Appendiċi.

1.6.2. **Il-metodu dinamiku**

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

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

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

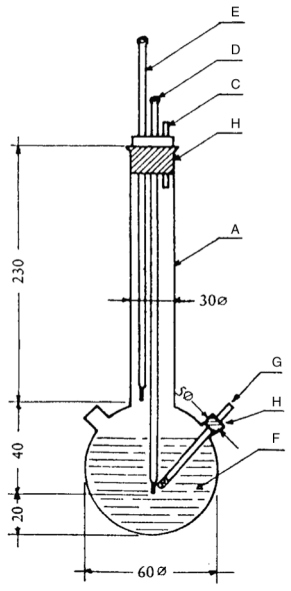
Ara l-Appendiċi.

1.6.4. **Il-metodu skond Siwoloboff**

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

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

Figura 1



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

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

▼B

Figura 2

Il-prinċipju skond Siwoloboff

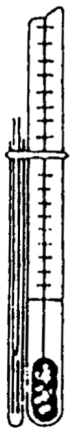
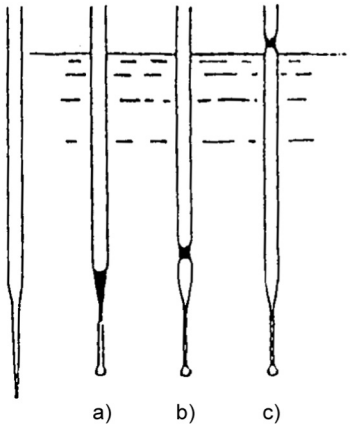


Figura 3

Il-prinċipju mmodifikat



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

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

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

1.6.5. **Osservazzjoni permezz ta' fotoċellula**

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

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

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

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

▼B

1.6.6. **Analiżi termika**

1.6.6.1. *Analiżi termika differenzjali*

Ara l-Appendiċi.

1.6.6.2. *Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar*

Ara l-Appendiċi.

2. **DATA**

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

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

fejn:

Δp = (101,325 – p) [nnota s-sinjal]

P = il-kejl tal-pressjoni f'kPa

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

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

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

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

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

Tabella 2

Temperatura – il-fatturi ta' korrezzjonijiet f_t

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

▼B

3. **RAPPURTAR**

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

— il-metodu użat

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

— kalkolu ta' l-eżattezza.

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

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

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

4. **REFERENZI**

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

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

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

▼B

Appendiċi

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

1. **L-ebulliometer**

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

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

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

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

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

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

▼B

A.3. DENSITÀ RELATTIVA

1. **METODU**

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

1.1. DAĦLA

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

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

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

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

1.4. TQABBIL TAL-METODI

Jintużaw erba' klassijiet ta' metodi

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

1.4.1.1. *Idrometru* (għal sustanzi likwidi)

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

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

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

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

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

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

▼B

1.4.2. **Metodi piknometriċi**

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

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

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

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

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

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

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

2. **DATA**

Ara l-istandards.

3. **RAPPURTAR**

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

— il-metodu użat,

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

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

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

▼B

Tabella

Applikabilità tal-metodi

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

M4. **REFERENZI**

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Appendiċi

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

1. **Il-metodi taż-żamma fil-wiċċ**

1.1 Idrometru

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

1.2 Miżien idrostatiku

Għal sustanzi solidi

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

Għal sustanzi likwidi

ISO 901	ISO 758

▼B

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

1.3 Metodu tat-tagħdis ta' l-oġġett

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

2. **Metodi piknometriċi**

2.1. Għal sustanzi likwidi

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

▼B

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

▼B

2.2. Għal sustanzi solidi

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

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

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

▼M1

A.4. PRESSJONI TA’ FWAR

1. METODU

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

1.1. INTORDUZZJONI

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

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

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

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

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

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

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

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

1 bar = 10^5 Pa

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

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

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

▼**M1**

Tabella 1

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

(1) Meta tuża capacitance manometer

1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST

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

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

fejn:

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

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

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

T = it-temperatura f'K

▼M1

1.4. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU

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

1.5.1.1. *Prinċipju*

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

Figura 1

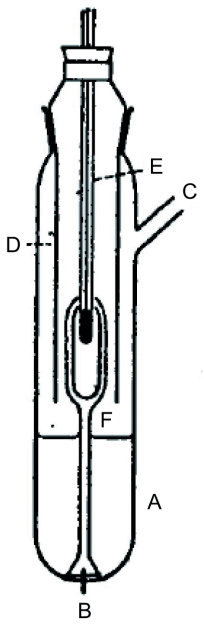
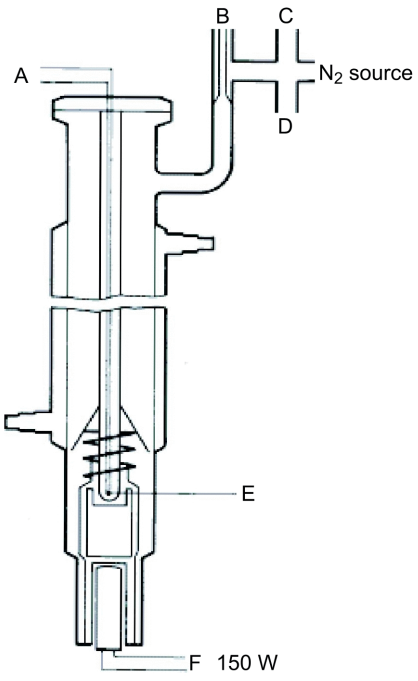


Figura 2



▼**M1**

Pompa ta’ Cottrell (4)

A: Akkopjament termiku

B: Volum ta’ buffer ta’ vojt

C: Arloġġ ta’ pressjoni

D: Vojt

E: Punt ta’ kejl

F: Element li jsaħħan ca. 150 W

1.5.1.2. *Apparat*

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

1.5.1.3. *Proċedura*

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

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

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

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

1.5.2. **Metodu statiku**

1.5.2.1. *Prinċipju*

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

▼**M1**

1.5.2.2. *Apparat*

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

1.5.2.3. *Proċedura*

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

Figura 3a

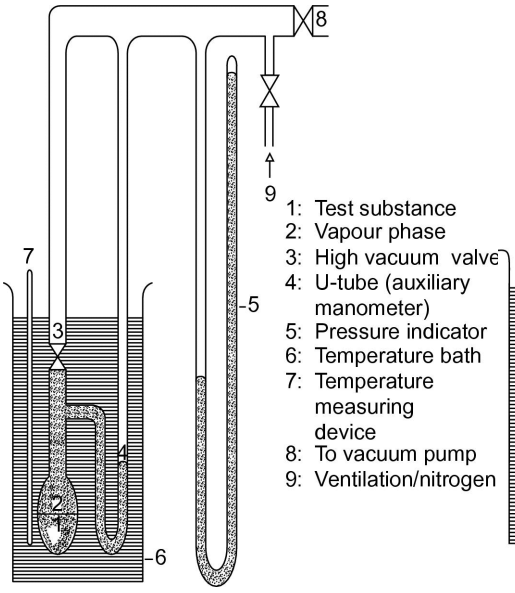
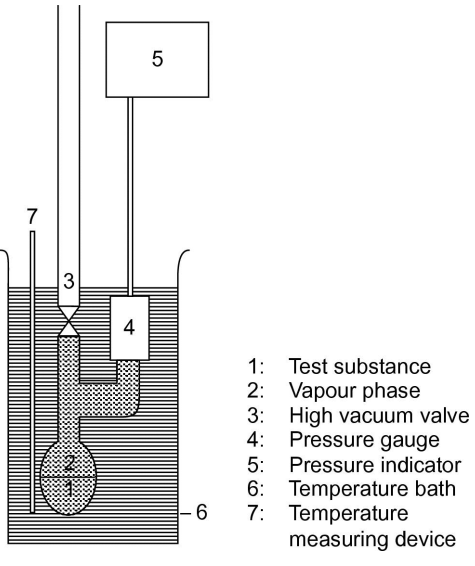


Figura 3b



▼**M1**

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

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

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

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

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

1.5.3. **Metodu ta' Iżoteniskopju**

1.5.3.1. *Prinċipju*

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

1.5.3.2. *Apparat*

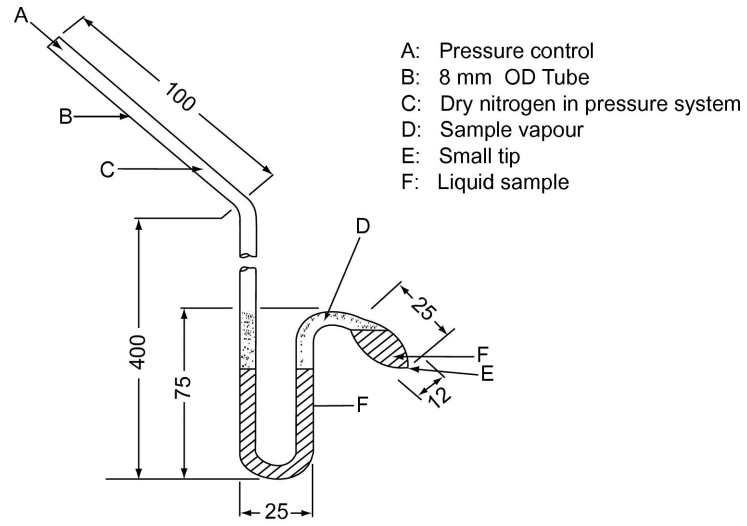
Eżempju ta' tagħmir ta' kejl huwa muri fil-figura 4. Deskrizzjoni sħiħa tinsab f'ASTM D 2879-86 (6).

▼M1

1.5.3.3. *Proċedura*

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

Figura 4



(Dimension in mm)

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

▼M1

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

1.5.4.1. *Prinċipju*

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

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

fejn:

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

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

T = temperatura (K)

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

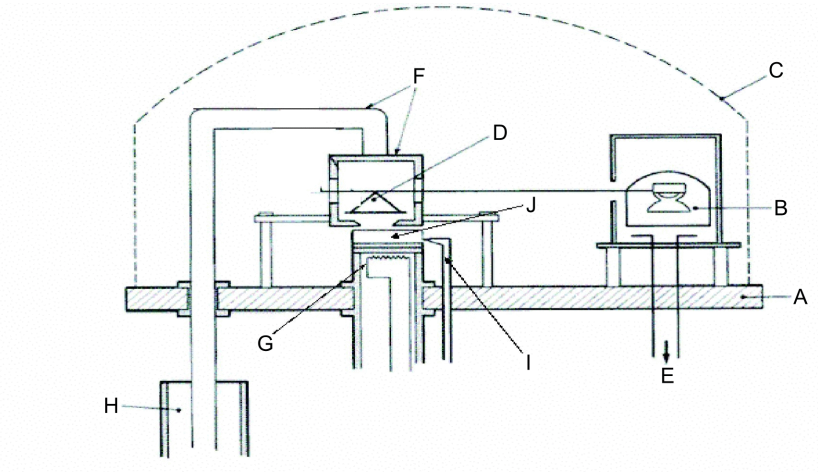
P = pressjoni ta' fwar (Pa)

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

1.5.4.2. *Apparat*

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

Figura 5



A: Sett ta' bażi

B: Għodda bi spirall jimxi

C: Vażett forma ta' qampiena

D: Miżien bi plattina

E: Dispożittiv li jkejjel il-vojt

F: Kaxxa li tkessaħ u lasta li tkessaħ

G: Forn evaporatur

H: Kunjett Dewar b'nitroġenu likwidu

I: Kejl ta' temperatura ta' kampjun

J: Sustanza tat-test

▼M1

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

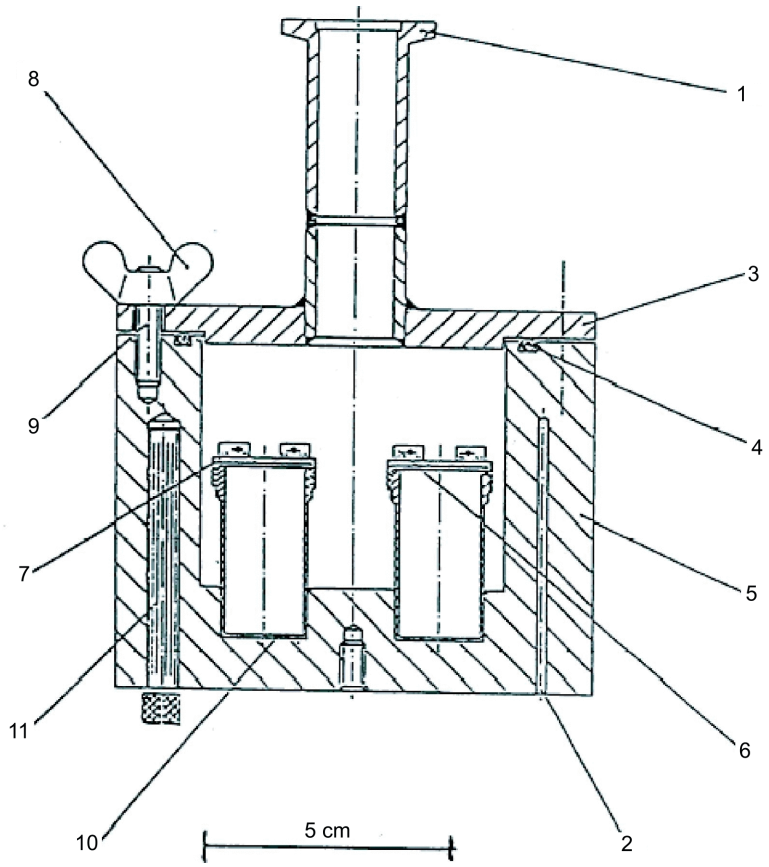
1.5.5.1. *Prinċipju*

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

1.5.5.2. *Apparat*

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

Figura 6



1: Konnessjoni mal-vojt

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

3: Għatu għat-tank tal-vojt

4: Ċirku-O

5: Tank tal-vojt tal-aluminju

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

7: Għatu meħjut

8: Skorfini farfett

9: Viti

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

11: Cartridge li ssaħħan

▼M1

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

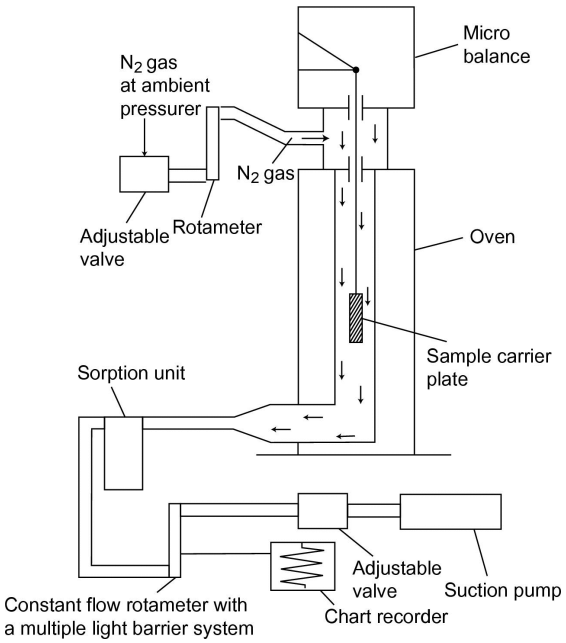
1.5.6.1. *Prinċipju*

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

1.5.6.2. *Apparat*

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

Figura 7



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

1.5.6.3. *Proċedura*

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

▼M1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.7.1. *Prinċipju*

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

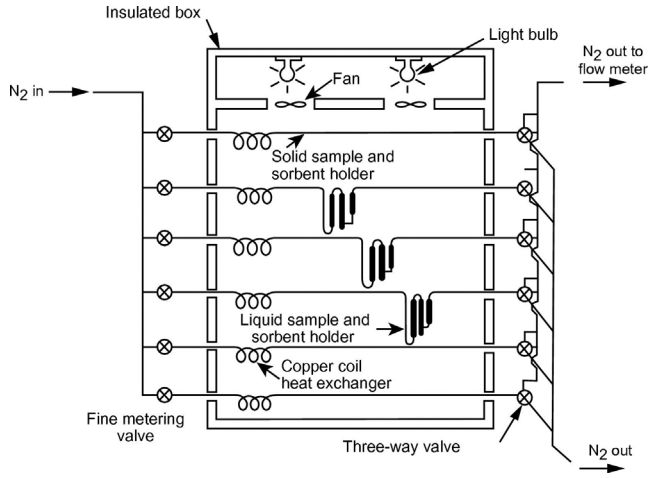
Il-proċedura ta’ saturazzjoni ta’ gass hija applikabbli għal sustanzi kimiċi solidi jew likwidi. Tista’ tiġi użata għal pressjonijiet ta’ fwar sa 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Dan il-metodu huwa l-iktar ta’ min joqgħod fuqu għal pressjonijiet ta’ fwar taħt 10^3 Pa. Fuq 103 Pa, il-pressjonijiet ta’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

1.5.7.2. *Apparat*

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

▼**M1**

Figura 8



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

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

Figura 9

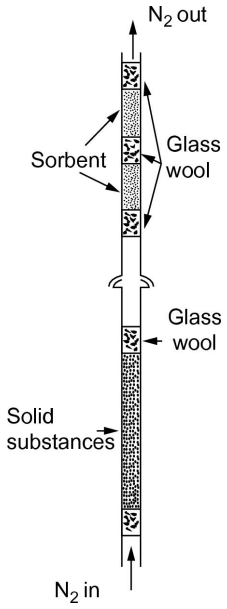
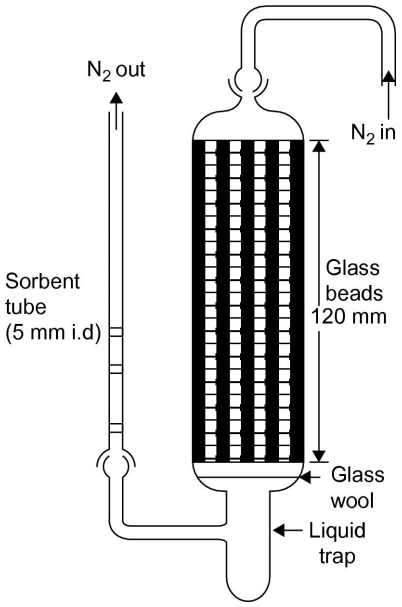


Figura 10



▼**M1**

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

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

1.5.7.3. *Proċedura*

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

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

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

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

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

fejn:

p = pressjoni ta’ fwar (Pa)

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

V = volum ta’ gass saturat (m^3)

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

T = temperatura (K)

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

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

▼M1

1.5.8. **Dawwar li jdur fuqu nnifsu**

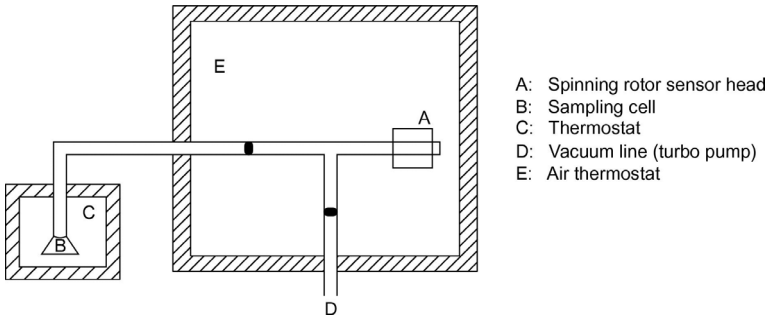
1.5.8.1. *Prinċipju*

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

1.5.8.2. *Apparat*

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

Figura 11



2. **DEJTA U RAPPURTAR**

2.1. DEJTA

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

2.2. RAPPORT TAT-TEST

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

— metodu użat,

▼**M1**

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

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

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

— id-dejta kollha oriġinali,

— kurva ta' log p versus 1/T,

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

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

— natura tal-bidla,

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

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

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

3. **LETTERATURA**

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

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

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

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

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

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

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

▼M1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼**M1**

Appendiċi

Metodu ta' stima

INTORDUZZJONI

Valuri stmati ta’ pressjoni ta’ fwar jistgħu jintuzaw:

— biex jiġi deċiż liema metodu sperimentali huwa xieraq;

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

METODU TA' STIMA

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

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

PROĊEDURA TA’ KALKOLAZZJONI

Il-pressjoni ta’ fwar hija kkalkulata kif ġej:

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

fejn:

T = temperatura ta’ interess

T_b = punt ta’ togħlija normali

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

ΔH_{Vb} = sħana ta’ vaporizzazzjoni

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

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

Flimkien ma’,

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

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

▼**M1**

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

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

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

RAPPORT

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

LETTERATURA

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

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

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

▼B

A.5. TENSJONI TAS-SUPERFIĊJE

1. METODU

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

1.1. DAĦLA

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

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

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

It-tensjoni tas-superfiċje tingħata bħala:

N/m (unità SI) jew

mN/m (sub-unità SI)

1 N/m = 10^3 dini/cm

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

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

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

1.4. PRINĊIPJI TAL-METODI

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

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

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

1.6.1. **Il-metodu tal-pjanċa**

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

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

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

1.6.3. **Metodu tal-ħolqa**

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

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

1.6.4.1. *Apparat*

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

— il-mejda mobbli għall-kampjun,

— is-sistema ta' kejl tal-qawwa,

— korp tal-kejl,

— reċipjent tal-kejl.

1.6.4.1.1. Mejda mobbli għall-kampjun

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

1.6.4.1.2. Sistema ta' kejl tal-qawwa

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

▼B

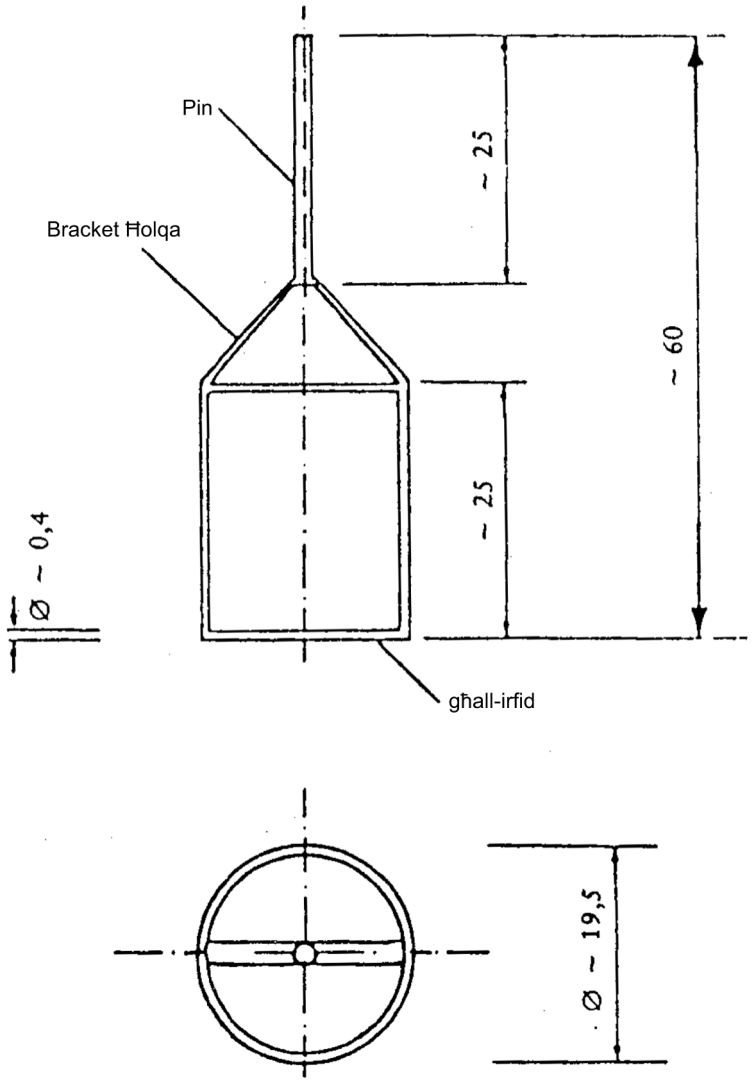
1.6.4.1.3. Korp ta' kejl (ħolqa)

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

Figura

Korp tal-kejl

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



1.6.4.1.4. Reċipjent tal-kejl

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

▼B

1.6.4.2. *Preparazzjoni ta' l-apparat*

1.6.4.2.1. T i n d i f

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

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

Nota:

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

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

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

Immuntar:

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

Aġġustament tal-punt żero:

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

Kalibrazzjonijiet:

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

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

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

fejn:

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

m = il-piż tar-rikkieb (g)

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

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

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

▼B

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

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

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

fejn:

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

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

1.6.4.3. *Preparazzjoni tal-kampjuni*

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

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

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

1.6.5. **Kondizzjonijiet tat-test**

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

1.6.6. **L-eżekuzzjoni tat-test**

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

▼B

2. **DATA**

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

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

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

Tabella

Korrezzjoni tat-tensjoni tas-superfiċje mkejla

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

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

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

▼B

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

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

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

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

fejn:

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

R = ir-raġġ tal-ħolqa

f = il-fattur ta' korrezzjoni (1)

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

— il-metodu użat,

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

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

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

▼B

— il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni,

— it-temperatura tat-test,

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

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

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

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

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

4. **REFERENZI**

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

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

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

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

▼M4

A.6. **SOLUBILITÀ FL-ILMA**

DAĦLA

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

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

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

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

DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

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

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

KIMIĊI TA' REFERENZA

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

DESKRIZZJONI TAL-METODI

Kundizzjonijiet tat-test

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

Test preliminari

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

▼M4

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

Tabella 1

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

Metodu ta' elużjoni tal-kolonna

Prinċipju

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

Apparat

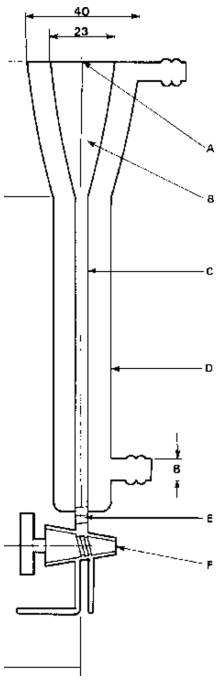
10. L-apparat jikkonsisti f'mikrokolonna (Figura 1), miżmuma f'temperatura kostanti. Huwa mqabbad ma' pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid (Figura 2) jew ma' reċipjent ta' livellar (Figura 3). Il-mikrokolonna jkun fiha rfid inert miżmum f'postu b'tapp żgħir tal-ħġieġ f'forma ta' fibri li jservi wkoll biex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

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

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

▼**M4**

Figura 1



Dimensjonijiet f'mm

A. Konnessjoni għal ġonta tal-qiegħ tal-ħġieġ

B. Spazju ta' fuq

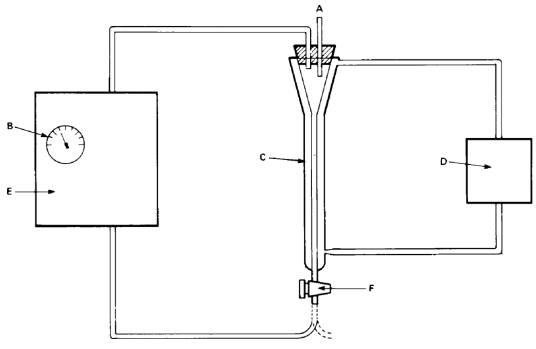
C. Ġewwa 5

D. Barra 19

E. Tapp tal-ħġieġ f'forma ta' fibri

F. Rubinett tal-għeluq

Figura 2



A. Ekwilibrazzjoni atmosferika

B. Apparat li jkejjel il-fluss

C. Mikrokolonna

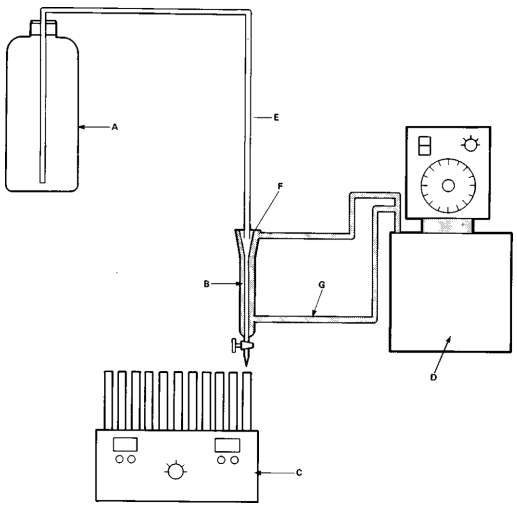
D. Pompa ta' ċirkolazzjoni kkontrollata termostatikament

E. Pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid

F. Valv bidirezzjonali għal teħid ta' kampjuni

▼M4

Figura 3



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

B. Kolonna

C. Akkumulatur ta' frazzjoni

D. Termostat

E. Tubu tat-teflon

F. Ġonta tal-qiegħ tal-ħġieġ

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

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

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

Proċedura li tuża pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid

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

▼M4

Proċedura li tuża reċipjent ta' livellar

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

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

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

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

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

Metodu tal-flixkun

Prinċipju

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

Apparat

22. Hemm bżonn il-materjali li ġejjin:

— ħġieġ u strumentazzjoni normali tal-laboratorju;

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

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

— apparat analitiku.

Proċedura

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

▼M4

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

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

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

Determinazzjonijiet analitiċi

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

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

Metodu ta' elużjoni tal-kolonna

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

Metodu tal-flixkun

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

Rapport tat-test

Metodu ta' elużjoni tal-kolonna

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

— ir-riżultati tat-test preliminari;

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

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

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

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

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

— il-metodu ta' analiżi;

— in-natura tal-materjal ta' rfid;

— il-preparazzjoni tal-materjal ta' rfid;

— solvent użat;

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

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

▼**M4**

Metodu tal-flixkun

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

— ir-riżultati tat-test preliminari;

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

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

— il-pH ta' kull kampjun;

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

— it-temperatura tat-test;

— il-metodu analitiku;

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

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

LETTERATURA:

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

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

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

▼B

A.8. KOEFFIĊJENT TAL-QSIM

1. METODU

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

1.1. DAĦLA

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

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

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

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

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

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

▼B

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

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

Metodu HPLC

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

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

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

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI

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

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

1.4.2. **Metodu HPLC**

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

▼B

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

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

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

1.5.1. **Ripetibilità**

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

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

Metodu HPLC

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

1.5.2. **Sensittività**

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

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

Metodu HPLC

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

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

▼B

1.5.3. **Speċifiċità**

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

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

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

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

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

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

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

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

1.6.2.1. *Preparazzjoni*

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

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

Nota:

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

1.6.2.1.1. Pre-saturazzjoni tas-solventi

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

▼B

1.6.2.1.2. Preparazzjoni għat-test

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

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

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

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

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

1.6.2.1.3. Is-sustanza għat-test

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

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.2.3. *Proċedura tal-kejl*

1.6.2.3.1. Kisba ta' l-ekwilibriju tal-qsim

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

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

1.6.2.3.2. Separazzjoni tal-fażi

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

▼B

1.6.2.4. *Analiżi*

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

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

— il-metodi fotometriċi,

— il-kromatografija tal-gass,

— il-kromatogrfija likwida ta' rendiment għoli.

1.6.3. **Metodu HPLC**

1.6.3.1. *Preparazzjoni*

Apparat

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

Faži mobbli

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

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

▼B

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

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

Sustanzi maħlula

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

Kondizzjonijiet tat-test

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

1.6.3.2. ***Kejl***

Kalkolu tal-ħin mejjet t_o

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

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

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

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

▼B

Graff ta' kalibrazzjoni

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

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

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

2. **DATA**

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun

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

3. **RAPPURTAR**

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

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

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

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

Għall-metodu taċ-ċaqliq tal-flixkun:

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

— it-temperatura tad-determinazzjoni,

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

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

▼B

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

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

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

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

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

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

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

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

Metodu HPLC:

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

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

— l-iskala tat-temperatura tad-determinazzjonijiet,

— il-pH li fih isiru d-determinazzjonijiet,

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

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

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

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

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

— il-profili ta' l-elużjoni,

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

— il-ħin mejjet u kif tkejjel.

▼B

4. **REFERENZI**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

▼B

Appendiċi 1

Metodi ta' stima/kalkolu

DAĦLA

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

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

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

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

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

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

METODU TA' STIMA

Stima preliminari tal-koeffiċjent tal-qsim

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

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

METODI TA' KALKOLU

Prinċipju tal-Metodi ta' Kalkolu

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

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

Kriterji ta' kwalità

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

▼B

Proċedura ta' kalkolu

Il-metodu Hansch π-

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

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

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

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

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

Metodu Rekker

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

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

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

Il-metodu Hansch-Leo

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

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

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

Metodu Kombinat

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

Rimarki

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

▼B

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

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

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

Rapport

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

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

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

— id-deskrizzjoni tal-metodu ta' kalkolu,

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

— il-pekularitajiet fil-għażla tal-frammenti,

— id-dokumentazzjoni komprensiva tal-kalkolu.

LETTERATURA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Appendici 2

Sustanzi ta' Referenza Rakkomandati għal Metodu HPLC

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

▼B

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

▼B

A.9. **IL-PUNT TA' FJAMMABILITÀ**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

Unitajiet: °C

$t = T - 273,15$

(t f' °C u T f'K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

1.5.1. **Ripetibbilità**

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

1.5.2. **Sensittività**

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

1.5.3. **Speċifiċità**

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

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Preparazzjonijiet**

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

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

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

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

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

1.6.3.1. *Metodu ta' l-ekwilibriju*

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

1.6.3.2. *Metodu ta' non-ekwilibriju*

Apparat Abel:

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

Apparat Abel-Pensky:

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

Apparat Tag:

Ara ASTM D 56.

Apparat Pensky-Martens:

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

Rimarki:

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

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

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

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

▼B

2. **DATA**

3. **RAPPURTAR**

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

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

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

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

4. **REFERENZI**

Xejn.

▼B

A.10. **FJAMMABILITÀ (SOLIDI)**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

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

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

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

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

1.2. TIFSIRA U UNITAJIET

Il-ħin tal-ħruq huwa muri f'sekondi.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.4. PRINĊIPJU TAL-METOD

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Test preliminari ta' orjentazzjoni**

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

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

1.6.2.1. *Preparazzjoni*

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

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

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.2.3. *L-eżekuzzjoni tat-test*

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

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

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

▼B

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

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

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

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

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

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

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

4. **REFERENZI**

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

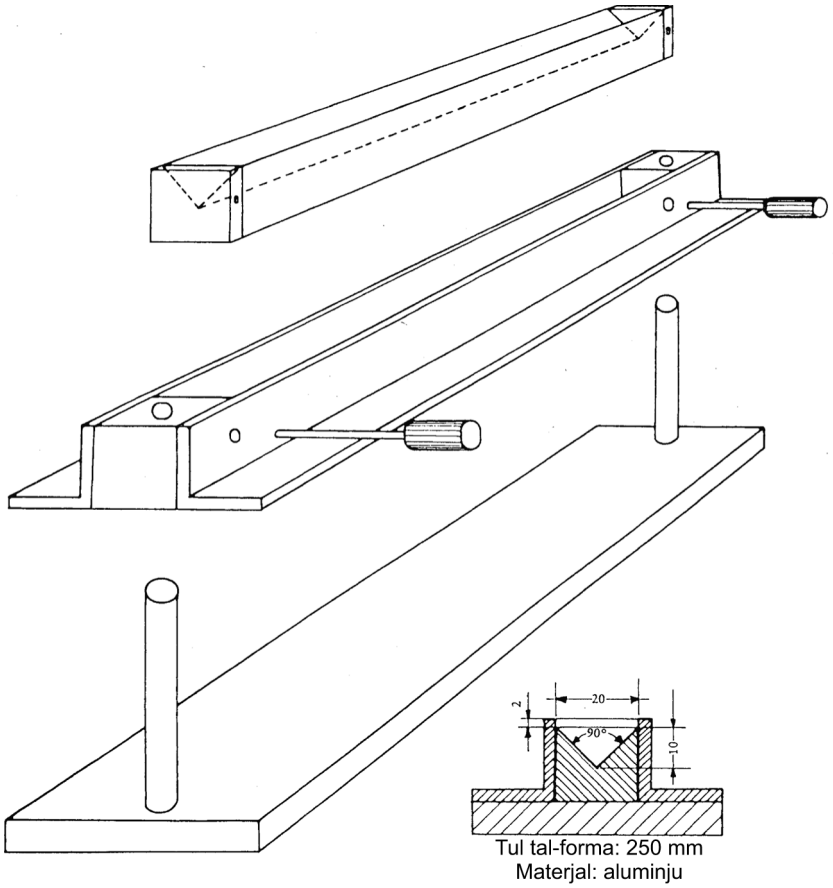
▼B

Appendiċi

Figura

Forom u aċċessorji għall-preparazzjoni tal-gozz

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



Tul tal-forma: 250 mm
Materjal: aluminju

▼B

A.11. **FJAMMABILITÀ (GASSIJIET)**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

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

1.2. TIFSIRA U UNITAJIET

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

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Apparat**

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

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

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

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

▼B

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

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

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPURTAR**

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

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

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

— it-temperatura li fiha twettaq it-test,

— il-konċentrazzjonijiet ippruvati u r-riżultati miksuba,

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

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

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

4. **REFERENZI**

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

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

▼B

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

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

1.3.1. **Pass 1**

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

1.3.2. **Pass 2**

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

1.3.2. **Pass 3**

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

1.3.4. **Pass 4**

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

▼B

1.4. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Pass 1**

1.6.1.1. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.1.2. *L-eżekuzzjoni tat-test*

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

1.6.2. **Pass 2**

1.6.2.1. *Apparat*

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

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.2.3. *L-eżekuzzjoni tat-test*

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

1.6.3. **Pass 3**

1.6.3.1. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.3.2. *L-eżekuzzjoni tat-test*

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

▼B

1.6.4. **Pass 4**

1.6.4.1. *Apparat*

L-apparat jiġi mmuntat kif jidher fil-figura.

1.6.4.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.4.3. *L-eżekuzzjoni tat-test*

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

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

2. **DATA**

Is-sustanza titqies li hija perikoluża jekk:

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

jew

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

3. **RAPPURTAR**

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

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

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

▼B

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

— l-identità kimika tal-gass evolut,

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

— kwalunkwe rimarki relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

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

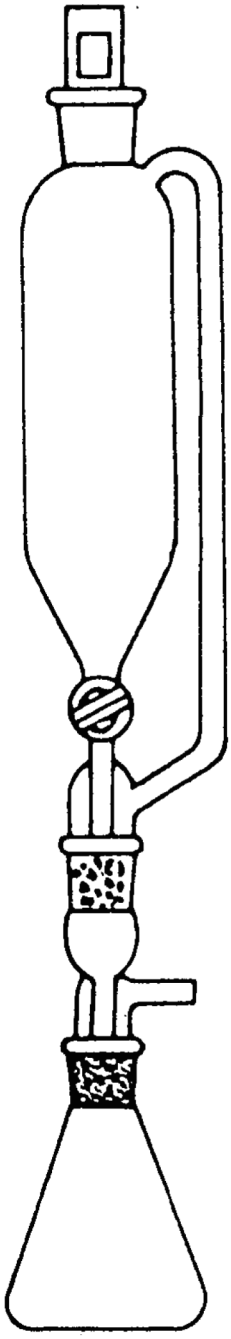
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Appendiċi

Figura

Apparat



▼B

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

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

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

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

1.2 TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TEST

1.6.1. **Apparat**

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

Nota:

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

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

▼B

1.6.2. **L-eżekuzzjoni tat-test**

a) *Solidi trab*

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

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

b) *Likwidi*

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

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

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

2. **DATA**

2.1. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

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

2.2. VALUTAZZJONI

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

3. **RAPPURTAR**

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

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

— ir-riżultat tat-test,

— kwalunkwe rimarka relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

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

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

▼B

A.14. **PROPRJETAJIET ESPLOŻIVI**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

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

Il-metodu fih tliet partijiet:

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

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

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

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

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Esplożiv:

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

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

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

▼B

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

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

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

1.4.2. **Sensittività termika**

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

1.4.3. **Sensittività mekkanika (xokk)**

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

1.4.4. **Sensittività mekkanika (frizzjoni)**

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

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

1.6.1.1. *Apparat*

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

▼B

1.6.1.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

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

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

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

1.6.1.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet*

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

▼B

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

1.6.1.4. *Valutazzjoni*

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

1.6.2. **Sensittività mekkanika (xokk)**

1.6.2.1. *Apparat (figura 4)*

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

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

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

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

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

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

▼B

1.6.2.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet*

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

1.6.2.4. *Valutazzjoni*

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

1.6.3. **Sensittività mekkanika (frizzjoni)**

1.6.3.1. *Apparat (figura 5)*

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

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

1.6.3.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

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

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

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

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

▼B

1.6.3.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet*

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

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

1.6.3.4. *Valutazzjoni*

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

2. **DATA**

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

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

— identità, kompożizzjoni, purità, kontenut ta' umdità eċċ. tas-sustanza ttestjata.

— il-forma fiżika tal-kampjun u jekk kienx imfarrak, miksur u/jew mgħarbul,

— l-osservjazzjonijiet matul it-testijiet għas-sensittività termika (eż. piż b'kampjun, numru ta' frammenti eċċ.),

— l-osservjazzjonijiet matul it-testijiet għas-sensittività mekkanika (eż. il-formazzjoni ta' ammonti konsiderevoli ta' duħħan jew dekompożizzjoni kompleta mingħajr rapport, fjammi, sparks, rapport, tifqigħ eċċ.),

— ir-riżultati ta' kull test,

— jekk intuża apparat alternattiv, trid tingħata ġustifikazzjoni alternattiva kif ukoll xhieda ta' korelazzjoni bejn riżultati miksuba b'apparat speċifiku u dawk miksuba b'apparat ekwivalenti,

▼B

— kwalunkwe kummenti utli bħal referenza għal testijiet bi prodotti simili li jistgħu jkunu relevanti għall-interpretazzjoni proprja tar-riżultati,

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

3.2. INTERPRETAZZJONI U VALUTAZZJONI TA' RIŻULTATI

Ir-rapport tat-test irid isemmi kwalunkwe riżultati li huma kkunsidrati foloz, anomali jew mhux rappreżentattivi. Jekk xi wieħed mir-riżultati għandu jitwarrab, għandha tingħata spjegazzjoni u r-riżultati ta' l-ittestjar supplimentari. Sakemm riżultat anomalu ma jkunx spjegat, irid ikun aċċettat skond l-apparenza u użat biex tkun ikklassifikata s-sustanza skond il-każ.

4. **REFERENZI**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use -Determination of explosion risk.

▼B

Appendiċi

Eżempju ta' speċifikazzjoni ta' materjal għal test ta' sensittività termika (ara DIN 1623)

(1) Tubu: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.0336.505 g

(2) Pjanċa mħaffra: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.4873

(3) Il-vit fil-kamin u l-iskorfina: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.3817

Figura 1

Apparat għat-test tas-sensittività termika

(d-dimensjonijiet kollha f'millimetri)

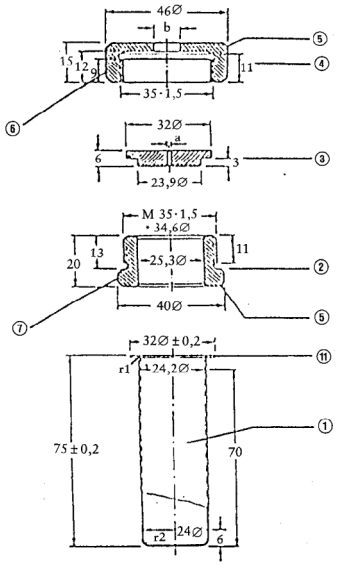


Fig. 1a Tubu ta' l-azzar u aċċessorji

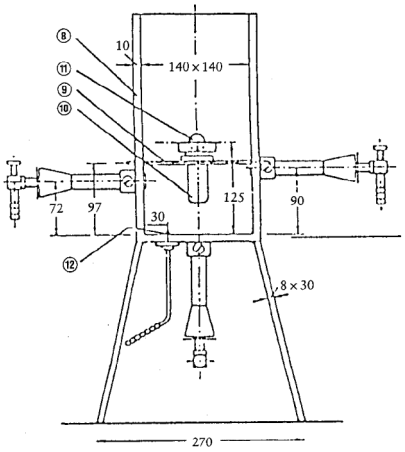


Fig. 1b Apparat ta' tisħin u protettiv

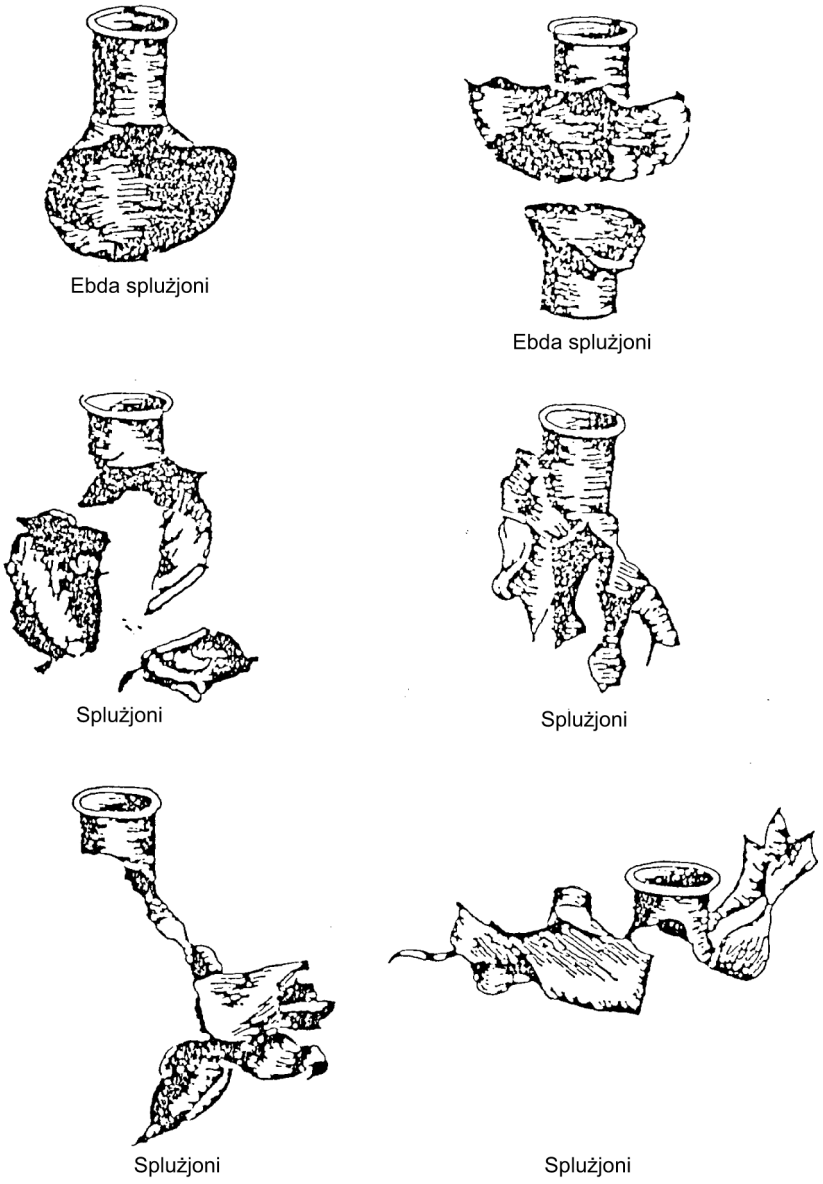
(1) tubu
(1a) flanġ ta' barra
(2) vit bil-kamin; ħajta bi frzzjoni żgħira
(3) pjanċa miftuħa a = dijametru ta' 2.0 jew 6.0 mm
(4) skorfina b = dijametru 10 mm
(5) superfiċje ċanfrin
(6) 2 flat għal spanner qies 41
(7) 2 flat għal spanner qies 36
(8) kaxxa li ma tinkisirx
(9) 2 vireg ta' rfid għat-tubu
(10) tubu mmuntat
(11) pożizzjoni għall-berner ta' wara; il-berners l-oħra jidhru
(12) merżuq pilota

▼B

Figura 2

Test tas-sensittività termika

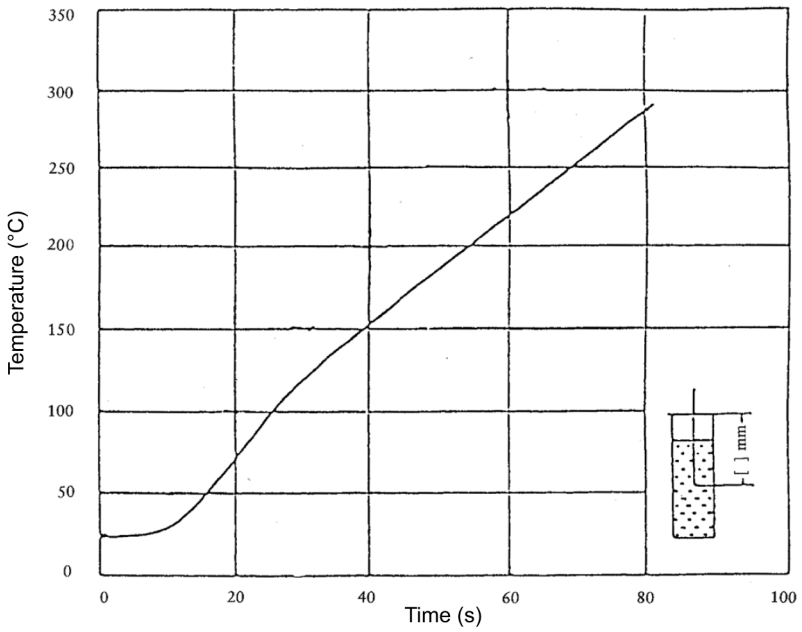
(eżempju ta' frammentazzjoni)



▼B

Figura 3

Il-kalibrazzjoni tar-rata ta' tiswin għat-test tas-sensittività termika



Il-kurvatura tat-temperatura/ħin miksuba bit-tiswin ta' *dibutyl phtalate* (27 cm^3) f'tubu magħluq (1,5 mm pjanċa mħaffra) bl-użu ta' rata ta' fluss tal-propan ta' 3,2 litru/minuta. It-temperatura tiġi mkejla b'termokoppja ta' azzar li ma jissaddadx miksi b'*chromel/alumel* ta' 1mm dijametru, impoġġija fiċ-ċentru 43 mm taħt ix-xifer tat-tubu. Ir-rata tat-tiswin bejn 135 °C u 285 °C għandha tkun bejn 185 u 215 K/minuta.

▼B

Figura 4

Apparat għat-test bix-xokk

(i-dimensjonijiet huma kollha f'millimetri)

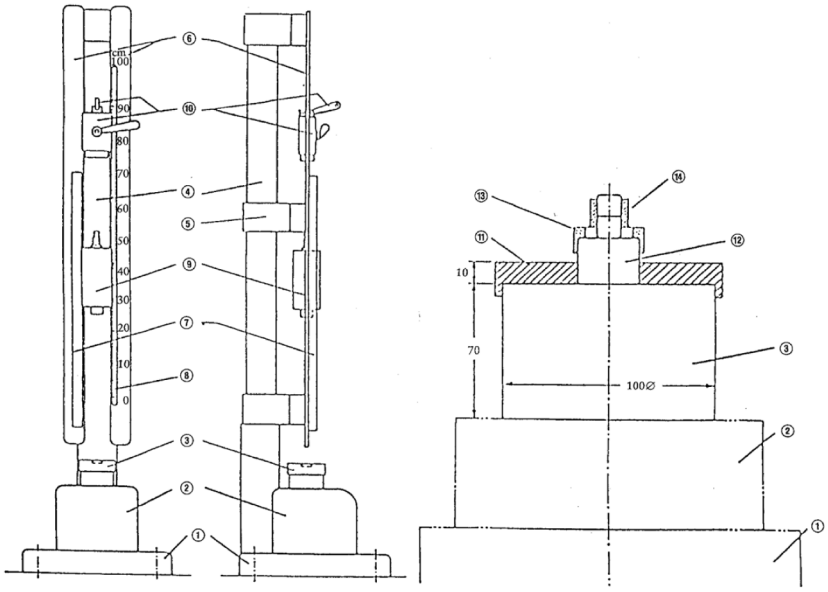


Fig 4a martell li jaqa', id-dehra ġenerali ta' quddiem u tal-ġenb

(1) bażi, 450 x 450 x 60
(2) blokka ta' l-azzar, 230 x 250 x 200
(3) inkwina, 100 dijametru x 70
(4) kolonna
(5) angolu li jsaħħaħ medjan
(6) 2 gwidi
(7) ingranaġġ bis-snien

Fig 4b Martell li jaqa', il-parti t'isfel

(8) skala ggradata
(9) martell li jaqa' (piż li jaqa')
(10) apparat li jżomm u jeħles
(11) pjanċa li torbot
(12) inkwina intermedjarja (li tinbidel), 26 dijametru x 26
(13) ħolqa li torbot bit-toqob
(14) apparat għall-impatt

▼B

Figura 4

Kontinwazzjoni

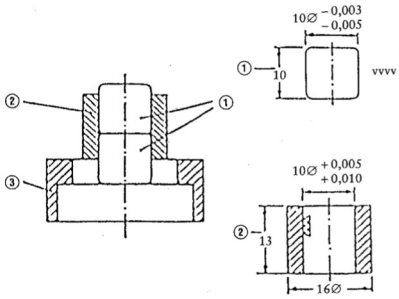


Fig. 4c Apparat tax-xokk għal sustanzi forma ta' trab jew pejst

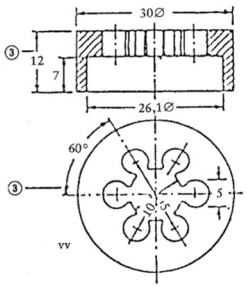
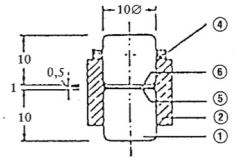


Fig 4d. Apparat tax-xokk għal sustanzi likwidi

(1) ċilindri ta' l-azzar
(2) ħolqa gwida għaċ-ċilindri ta' l-azzar
(3) ħolqa li torbot b'fetħiet
(a) taqsima vertikali
(b) pjan
(4) ħolqa tal-lastiku
(5) sustanza likwida (40 mm^3)
(6) space free from liquid



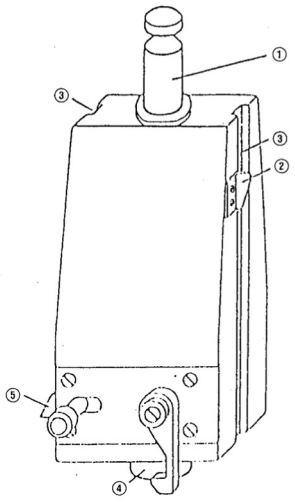


Fig. 4e Martell (piż li jaqa' ta' 5 kg)

(1) plagg għas-sospensjoni
(2) werrej ta' l-għoli
(3) groove għall-pożizzjoni
(4) ras ċilindrika għad-daqqa
(5) molla li treġġa' lura

▼B

Figura 5

Apparat għas-sensittività tal-frizzjoni.

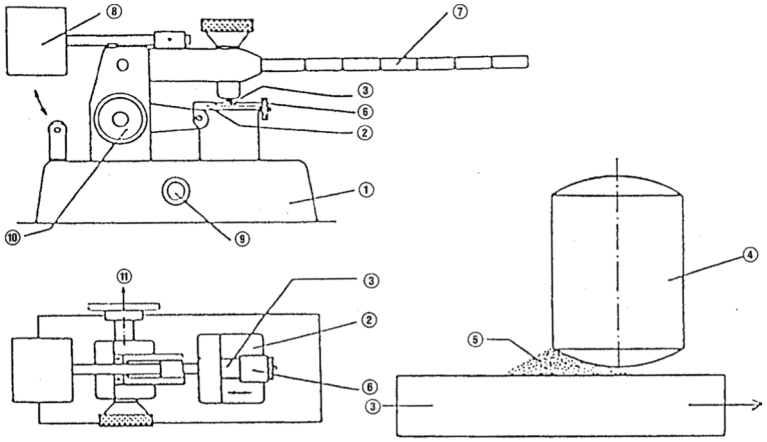


Fig 5a. Apparat ta'frizzjoni; elevazzjoni u veduta mill-ġenb

(1) bażi ta' l-azzar
(2) keriġ li terfa' u timxi
(3) pjanċa tal-porċellana, 25 × 25 × 5 mm fuq il-keriġ
(4) ċilindru fiss tal-porċellana 10 dijametru × 15 mm

Fig 5b Pożizzjoni tal-bidu taċ-ċilindru fuq il-kampjun

(5) il-kampjun għat-test, approssimattivament 10 mm^3
(6) apparat li jżomm iċ-ċilindru
(7) driegħ li jgħafas
(8) kontrapiż
(9) swiċċ
(10) rota biex tissettja l-keriġ fil-pożizzjoni tal-bidu
(11) direzzjoni lejn il-mutur ta' l-elettriku

▼B

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

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

Sustanzi esplożivi u sustanzi li jaqbdu spontanjament f'kuntatt ma' l-arja f'temperatura ambjentali m'għandhomx ikunu sottomessi għal dan it-test. Il-proċedura tat-test hija applikabbli għal gassijiet, likwidi u fwawar li, fil-preżenza ta' l-arja, jistgħu jitqabbdu b'superfiċje sħuna.

It-temperatura ta' l-awto-fjammabilità tista' titqies imnaqqsa b'mod konsiderevoli bil-preżenza ta' impuritajiet katalitiċi, b'materjal tas-superfiċje u b'volum akbar tar-reċipjent tat-test.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Il-grad ta' l-awto-fjammabilità huwa espress f'termini ta' temperatura ta' awto-fjammabilità. It-temperatura ta' l-awto-fjammabilità hija l-inqas temperatura li fiha s-sustanza għat-test taqbad meta mħallta ma' l-arja taħt kondizzjonijiet imfissra fil-metodu tat-test.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza huma ċitati fl-istandards (ara 1.6.3.). Huma għandhom iservu primarjament biex jiċċekkjaw ir-rendiment tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu tqabbil ma' riżultati minn metodi oħra.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Il-metodu jiddetermina t-temperatura minima tal-qoxra ta' ġewwa ta' reċipjent magħluq li tirriżulta fil-fjammabilità ta' gass, fwar jew likwidu injettat fir-reċipjent.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ir-ripetibbilità tvarja skond l-iskala ta' l-awto-fjammabilità u l-metodu tat-test użat.

Is-sensittività u l-ispeċifiċità jiddependu fuq il-metodu tat-test użat.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Apparat**

L-apparat huwa mfisser fil-metodu riferut f'1.6.3.

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

Kampjun tas-sustanza tat-test jiġi ttestjat skond il-metodu msemmi f'1.6.3.

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

Ara IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B

2. **DATA**

Irreġistra t-temperatura tat-test, il-pressjoni atmosferika, il-kwantità użata mill-kampjun u l-intervall ta' ħin sakemm issir il-fjammabilità.

3. **RAPPURTAR**

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

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

— il-kwantità ta' kampjun użata, il-pressjoni atmosferika,

— l-apparat użat,

— ir-riżultat tal-kejl (temperaturi tat-test, riżultati li jirrigwardaw il-fjammabilità, u l-intervalli ta' ħin korrispondenti),

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

4. **REFERENZI**

Xejn.

▼B

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

1. **METODU**

1.1 DAĦLA

Sustanzi esplożivi u sustanzi li jaqbdu spontanjament f'kuntatt ma' l-arja f'temperatura ambjentali m'għandhomx ikunu sottomessi għal dan it-test.

L-għan ta' dan it-test huwa li jipprovdi informazzjoni preliminari dwar l-awto-fjammabilità ta' sustanzi solidi f'temperaturi elevati.

Jekk is-sħana li tiżviluppa jew b'reazzjoni tas-sustanza ma' l-ossiġenu jew b'dekompożizzjoni eżotermika ma tintilifx malajr biżżejjed fil-madwar, iseħħ awto-tisħin li jwassal għall-awto-fjammabilità. Awto-fjammabilità għalhekk isseħħ meta r-rata ta' produzzjoni tas-sħana taqbeż ir-rata tat-telf tas-sħana.

Il-proċedura tat-test hija utli bħala test ta' skrinjar preliminari għal sustanzi solidi. Minħabba n-natura komplessa tal-fjammabilità u l-kombustjoni ta' solidi, it-temperatura ta' l-awto-fjammabilità ddeterminata skond dan il-metodu ta' test għandha tintuża għal għanijiet ta' tqabbil biss.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

It-temperatura ta' awto-fjammabilità kif miksuba b'dan il-metodu hija t-temperatura ambjentali minima espressa f' °C li fiha ċertu volum ta' sustanza jaqbad taħt kondizzjonijiet definiti.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Ċertu volum tas-sustanza għat-test jitpoġġa f'forn f'temperatura ambjentali; il-kurva tat-temperatura/ħin relatata mal-kondizzjonijiet f'nofs il-kampjun tiġi rreġistrata waqt li t-temperatura tal-forn tiżdied sa 400 °C, jew sal-punt tat-tidwib jekk dan huwa iżgħar, b'rata ta' 0,5 °C/min. Għall-għan ta' dan it-test, it-temperatura tal-forn li fiha t-temperatura tal-kampjun tilħaq 400 C b'awto-tisħin tissejjaħ it-temperatura ta' l-awto-fjammabilità.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Apparat**

1.6.1.1. *Forn*

Forn tal-laboratorju pprogrammat b'temperatura (volum ta' madwar 2 litri) mgħammar b'ċirkolazzjoni ta' l-arja naturali u bi sfog għal splużjoni. Bil-għan li jkun evitat ir-riskju ta' splużjoni potenzjali, kwalunkwe gassijiet ta' dekompożizzjoni m'għandhomx jitħallew jagħmlu kuntatt ma' l-elementi elettriċi tat-tisħin.

▼B

1.6.1.2. *Kubu b'xibka tal-wajer irqiq*

Biċċa xibka tal-wajer irqiqa ta' l-azzar li ma jissaddadx b'feṫiet ta' 0,045 mm għandha tinqata' skond id-disinn f'figura 1. Ix-xibka għandha tintewa u tintrabat b'wajer f'forma ta' kubu bil-parti ta' fuq miftuħa.

1.6.1.3. *Termokoppji*

Termokoppji adattati.

1.6.1.4. *Rekorder*

Kwalunkwe rekorder b'żewġ kanali kkalibrati minn 0 sa 600 °C jew vultaġġ korrispondenti.

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

Is-sustanzi jiġu ttestjati kif riċevuti.

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

Il-kubu jimtela bis-sustanza għat-test u jittaptap bil-mod, u tiżdied aktar sustanza sakemm il-kubu jkun mimli kompletament. Il-kubu mbagħad jiġi sospiż fiċ-ċentru tal-forn f'temperatura ambjentali. Termokoppja titpoġġa fiċ-ċentru tal-kubu u oħra bejn il-kubu u l-ġenb tal-forn biex tirreġistra t-temperatura tal-forn.

It-temperaturi tal-forn u tal-kampjun jiġu rreġistrati kontinwament waqt li t-temperatura tal-forn tiġi miżjuda għal 400 C, jew għat-temperatura tat-tidwib jekk din tkun iżgħar, bir-rata ta' 0,5 °C/min.

Meta s-sustanza tqabbad it-termokoppja kampjun turi żieda qawwija fit-temperatura ogħla mit-temperatura tal-forn.

2. **DATA**

It-temperatura tal-forn li fiha t-temperatura kampjun tilħaq l-400 °C b'awto-tisħin hija relevanti għal valutazzjoni (ara figura 2).

3. **RAPPURTAR**

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

— deskrizzjoni tas-sustanza għat-test,

— ir-riżultati tal-kejl inkluża l-kurva tat-temperatura/ħin,

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

4. **REFERENZI**

NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

Figura 1

Disinn ta' kubu tat-test ta' 20 mm

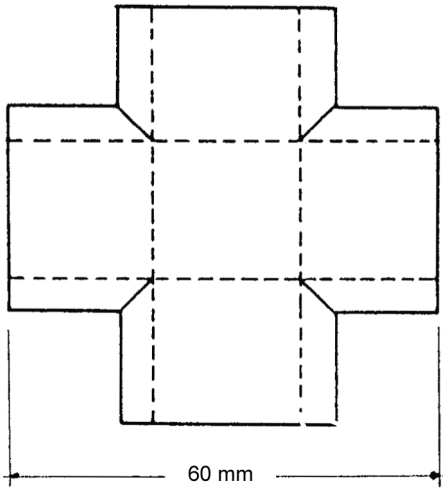
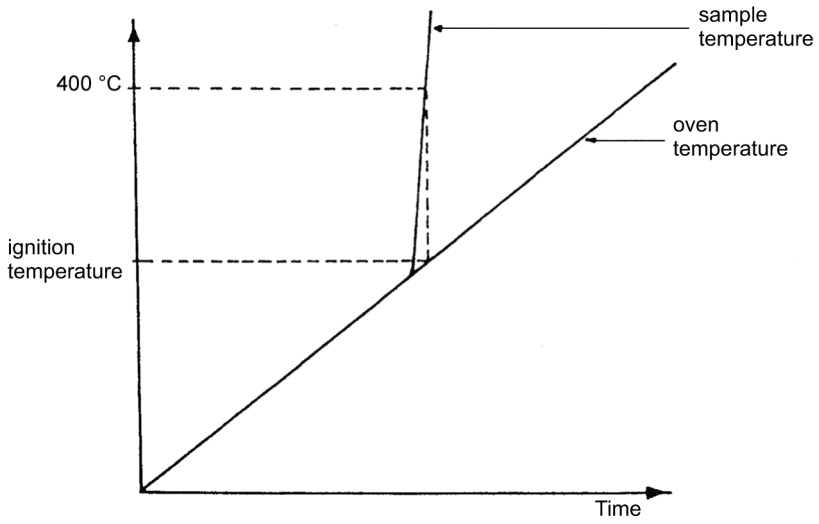


Figura 2

Kurva tipika tat-temperatura/ħin



▼B

A.17. **PROPRJETAJIET OSSIDANTI (SOLIDI)**

1. **METODU**

1.1. DAĦLA

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

Dan it-test mhuwiex applikabbli għal likwidi, gassijiet, sustanza fjammabbli jew esplożivi ħafna, jew perrossidi organiċi.

Dan it-test jista' ma jsirx meta eżami tal-formula strutturali jist-abbilixxi mingħajr ebda dubju raġjonevoli li s-sustanza mhijiex kapaċi li tirreaġixxi eżotermikament ma' materjal kombustibbli.

Bil-għan li jkun żgurat jekk it-test għandux jitwettaq bi prekawzjonijiet speċjali, għandu jitwettaq test preliminari.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Ħin tal-kombustjoni: żmien ta' reazzjoni, f'sekondi, meħud għaż-żona ta' reazzjoni biex timxi mal-gozz, wara l-proċedura mfissra f'1.6.

Rata ta' kombustjoni: espressa f'millimetri għal kull sekonda.

Rata massima ta' kombustjoni: l-ogħla valur ta' rati ta' kombustjoni miksuba b'taħlitiet li jinkludu minn 10 sa 90 % bil-piż ta' ossidant.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Nitrat tal-barju (grad analitiku) huwa użat bħala sustanza ta' referenza għat-test u t-test preliminari.

It-taħlita ta' referenza hija dik it-taħlita ta' nitrat tal-barju b'ċelluloża f'forma ta' trab, ippreparat skond 1.6, li għandu rata ta' kombustjoni massima (is-soltu taħlita b'60 % nitrat tal-barju bil-piż).

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Test preliminari jitwettaq fl-interess tas-sikurezza. Ma jkunx meħtieġ aktar ittestjar meta t-test preliminari jindika b'mod ċar li s-sustanza għat-test għandha proprjetajiet ossidanti. Meta dan mhuwiex il-każ, is-sustanza mbagħad għandha tkun soġġetta għat-test sħiħ.

Fit-test sħiħ, is-sustanza għat-test u sustanza kombustibbli definita tiġi mħallta fi proporzjonijiet diversi. Kull taħlita mbagħad tiġi ffurmata f'gozz u l-gozz jitqabbad f'tarf minnu. Ir-rata ta' kombustjoni massima ddeterminata titqabbel mar-rata ta' kombustjoni massima tat-taħlita ta' referenza.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Jekk ikun meħtieġ, kwalunkwe metodu ta' ħin u taħlit huwa validu bil-kondizzjoni li d-differenza fir-rata ta' kombustjoni massima fis-sitt testijiet separati tarja mill-valur medju aritmetiku b'mhux aktar minn 10 %.

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Preparazzjoni**

1.6.1.1. *Is-sustanza għat-test*

Naqqas il-kampjun għat-test għal daqs ta' partikula < 0,125 mm bl-użu tal-proċedura li ġejja: għarbel is-sustanza għat-test, iżżan il-frazzjoni li jkun baqa', irrepeti l-proċedura sakemm il-porzjon kollha għat-test tkun għaddiet mill-għarbiel.

Jista' jintuża kwalunkwe metodu ta' żżin jew ta' tgħarbil li jissodisfa l-kriterji ta' kwalità.

Qabel tiżżejja t-taħlita s-sustanza titnixxef f'105 °C, sakemm jinkiseb il-piż kostanti. Jekk it-temperatura ta' dekompożizzjoni tas-sustanza għat-test hija taħt il-105 °C, is-sustanza għandha titnixxef b'temperatura adattata iktar baxxa.

1.6.1.2. *Sustanza kombustibbli*

Ċelluloża f'forma ta' trab hija użata bħala sustanza kombustibbli. Iċ-ċelluloża għandha tkun tat-tip użata għal kromatografija ta' saff irqiq jew għal kromatograja tal-kolonna. Waħda tat-tip b'fibri ta' tul ta' aktar minn 85 % bejn 0,020 u 0,075 mm instabu li kienu adattati. It-trab taċ-ċelluloża jiġi mgħoddi minn għarbiel b'toqob ta' daqs ta' 0,125 mm. L-istess lott ta' ċelluloża għandu jintuża matul it-test.

Qabel tiżżejja t-taħlita, iċ-ċelluloża f'forma ta' trab titnixxef f'105 °C, sakemm jinkiseb piż kostanti.

Jekk tintuża ċ-ċana ta' l-injam fit-test preliminari, allura pprepara ċ-ċana ta' l-injam artab billi tiġbor il-porzjon li tgħaddi minn għarbiel b'toqob ta' 1,6 mm, ħallat sewwa, imbagħad nixxef f'105 °C għal erba' sigħat f'saff ta' mhux oħxon aktar minn 25 mm. Kessaħ u aħżen f'kontenitur li fih ma jidħolx arja mimli kemm sa kemm huwa prattiku u sakemm ikun meħtieġ, preferibbilment fi żmien 24 siegħa mit-tnixxif.

1.6.1.3. *Għajn ta' fjammabiltà*

Fjamma taħraq minn berner tal-gass (dijametru minimu ta' 5 mm) għandha tintuża bħala l-għajn ta' fjammabilità. Jekk tintuża għajn ta' fjammabbiltà oħra (eż. meta jsir it-test f'atmosfera inerta), id-deskrizzjoni u l-ġustifikazzjoni għandhom ikunu rrapurtati.

1.6.2. **L-eżekuzzjoni tat-test**

Nota:

Taħlitiet ta' ossidaturi ma' ċelluloża jew ċana ta' l-injam iridu jkunu ttrattati bħala potenzjalment splussivi u mmaniġġjati b'attenzjoni xierqa.

1.6.2.1. *Test preliminari*

Is-sustanza mnixxfa hija mħallta sewwa ma' ċelluloża mnixxfa jew ċana ta' l-injam fil-proporzjonijiet ta' 2 ta' sustanza għat-test għal 1 ta' ċelluloża jew ċana ta' l-injam bil-piż u t-taħlita tiġi ffurmata f'gozz żgħir forma ta' kon ta' dimensjonijiet 3,5 cm (dijametru tal-bażi) x 2,5 cm (għoli) pemezz tal-mili, mingħajr rass, ta' oġġett li jifforma kon (eż. lembut tal-ħġieġ tal-laboratorju biż-żennuna magħluqa).

▼B

Il-gozz jitpoġġa fuq pjanċa tal-baži li mhijiex kombustibbli, mhux poruża u b'konduttività baxxa ta' sħana. It-test għandu jitwettaq f'armarju tad-duħħan bħal f'1.6.2.2.

L-għajn tal-fjammabbiltà jitressaq f'kuntatt mal-kon. Is-saħħa u d-dewmien tar-reazzjoni riżultanti għandhom ikunu osservati u rreġistrati.

Is-sustanza għandha tkun ikkunsidrata bħala ossidanti jekk ir-reazzjoni hija qawwija.

Fi kwalunkwe każ fejn ir-riżultat huwa dubjuż, imbagħad ikun neċessarju li jsir it-test kollu mfisser hawn taħt.

1.6.2.2. *It-test tas-serje*

Ipprepara taħlitiet ta' ossidatur ċelluloża li jkun fihom minn 10 sa 90 % piż ta' ossidatur f'żidiet ta' 10 %. F'każijiet li kważi qegħdin fl-istess limiti, taħlitiet ta' ossidatur ċelluloża intermedji għandhom jintużaw biex tinkiseb ir-rata ta' fjammabbiltà massima b'aktar preċiżjoni.

Il-gozz ikun iffurmat permezz ta' forma. Din il-forma magħmula mill-metall, għandha tul ta' 250 mm b'taqsima trasversali trijangulari ta' għoli intern ta' 10 mm u wisa' interna ta' 20 mm. Żewġ pjanċi tal-metall jiġu mmuntati fuq iż-żewġ naħat tal-forma f'direzzjoni lonġitudinali bħala limitazzjonijiet laterali li joħorġu 2 mm "il barra mit-tarf l-għoli tat-taqsima trasversali trijangulari (figura). Dan l-arranġament jimtela liberament bi ftit taħlita żejda. Wara li l-forma tintefa" għal darba waħda minn għoli ta' 2 cm fuq superfiċje solida, is-sustanza żejda li tibqa' titneħħa b'karta milwija. Il-limitazzjonijiet laterali jitneħħew u t-trab li jibqa' jiħi ċċattjat, permezz ta' romblu. Pjanċa ta' baži mhux kombustibbli, mhux poruża u b'konduttività ta' sħana baxxa mbagħad titpoġġa fuq il-forma, l-apparat jinqaleb u l-forma titneħħa.

Irranġa l-gozz fil-kurrent ta' l-arja f'armarju li jiġbed id-duħħan.

Il-veloċità ta' l-arja trid tkun suffiċjenti biex tevita li d-duħħan joħroġ fil-laboratorju u m'għandhiex tkun varjata matul it-test. L-apparat irid ikun protett mill-kurrent ta' l-arja.

Minħabba l-igroskopiċità taċ-ċelluloża u ta' wħud mis-sustanzi għat-test, it-test għandu jitwettaq malajr kemm jista' jkun.

Qabbad ġenb wieħed tal-gozz billi tressqu mal-fjamma.

Kejjel il-ħin tar-reazzjoni fuq distanza ta' 200 mm wara li ż-żona ta' reazzjoni tinfirex sa distanza inizjali ta' 30 mm.

It-test jitwettaq bis-sustanza ta' referenza u ta' l-inqas darba b'kull waħda mill-firxa ta' taħlitiet tas-sustanza għat-test maċ-ċelluloża.

Jekk ir-rata ta' fjammabilità massima tinsab li hija akbar b'mod sinifikanti minn dik tat-taħlita ta' referenza, it-test jista' jitwaqqaf; inkella t-test għandu jkun ripetut għal ħames darbiet għal kull waħda mit-tliet taħlitiet li jagħtu l-aktar rata veloċi ta' fjammabilità.

▼B

Jekk hemm suspett li r-riżultat huwa pożittiv falz, allura t-test għandu jkun ripetut bl-użu ta' sustanza inerta bl-istess daqs ta' partikula, bħall-*kieselguhr*, flok iċ-ċelluloża. Alternattivament, it-taħlita tas-sustanza għat-test maċ-ċelluloża, li għandha l-aktar rata veloċi ta' fjammabilità, għandha tkun ittestjata mill-ġdid f'atmosfera inerta (< 2 % v/v kontenut ta' ossiġnu).

2. **DATA**

Għal raġunijiet ta' sikurezza r-rata ta' fjammabilità massima – mhux il-valur medju – għandha tkun ikkunsidrata bħala l-proprjetà ossidanti karatteristika tas-sustanza għat-test.

L-ogħla valur tar-rata tal-fjammabilità f'serje ta' sitt testijiet ta' taħlita definita huwa relevanti għall-valutazzjoni.

Pinġi graff ta' l-ogħla valur tar-rata tal-fjammabilità għal kull taħlita kontra l-konċentrazzjoni ta' l-ossidatur. Mill-graff ħu r-rata tal-fjammabilità massima.

Is-sitt valuri mkejla tar-rata tal-fjammabilità f'serje miksuba mit-taħlita mar-rata ta' fjammabilità massima ma tridx tiddiferenzja mill-valur medju aritmetiku b'aktar minn 10 %; inkella l-metodi tat-tħin u t-taħlit jridu jittejbu.

Qabbel ir-rata ta' fjammabilità massima miksuba mar-rata ta' fjammabilità massima tat-taħlita ta' referenza (ara 1.3).

Jekk it-testijiet jitwettqu f'atmosfera inerta, ir-rata ta' reazzjoni massima titqabbel ma' dik tat-taħlita ta' referenza f'atmosfera inerta.

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk huwa possibli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-identità, il-kompożizzjoni, il-purità, il-kontenut ta' umdità eċċ. tas-sustanza ttestjata;

— kwalunkwe trattament tal-kampjun għat-test (eż. tħin, tnixxif);

— l-għajn tal-fjammabbiltà użata fit-testijiet;

— ir-riżultati tal-kejl;

— il-mod ta' reazzjoni (eż. fjammabilità lelliexa fuq is-superfiċje, fjammabilità tul il-massa kollha, kwalunkwe informazzjoni li tirrgwarda l-prodotti ta' kombustjoni, ...);

— ir-rimarki rilevanti kollha għall-interpretazzjoni tar-riżultati, inkluża deskrizzjoni ta' l-enerġija fiżika (fjamma, spark, duħħan, ħruq bil-mod sakemm isir faħam, eċċ.) u t-tul ta' żmien approssimattiv prodott fit-test preliminari tas-sikurezza/-skrinjar kemm għas-sustanza għat-test kif ukoll għal dik ta' referenza;

— ir-riżultati minn testijiet b'sustanza inerta, jekk hemm;

— ir-riżultati minn testijiet f'atmosfera inerta, jekk hemm.

▼B

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Sustanza titqies li hija sustanza ossidanti meta:

(a) fit-test preliminari, hemm reazzjoni vigoruża;

(b) fit-test sħiħ, ir-rata ta' fjammabilità massima tat-taħlitiet ittestjati hija ogħla minn jew ugwali għar-rata ta' fjammabilità massima tat-taħlita ta' referenza taċ-ċelluloża u n-nitrat tal-barju.

Bil-għan li jkun evitat pożittiv falz, ir-riżultati miksuba meta s-sustanza għat-test titħallat ma' materjal inert u/jew meta jsir l-ittestjar taħt atmosfera inerta, għandhom jiġu kkunsidrati wkoll fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

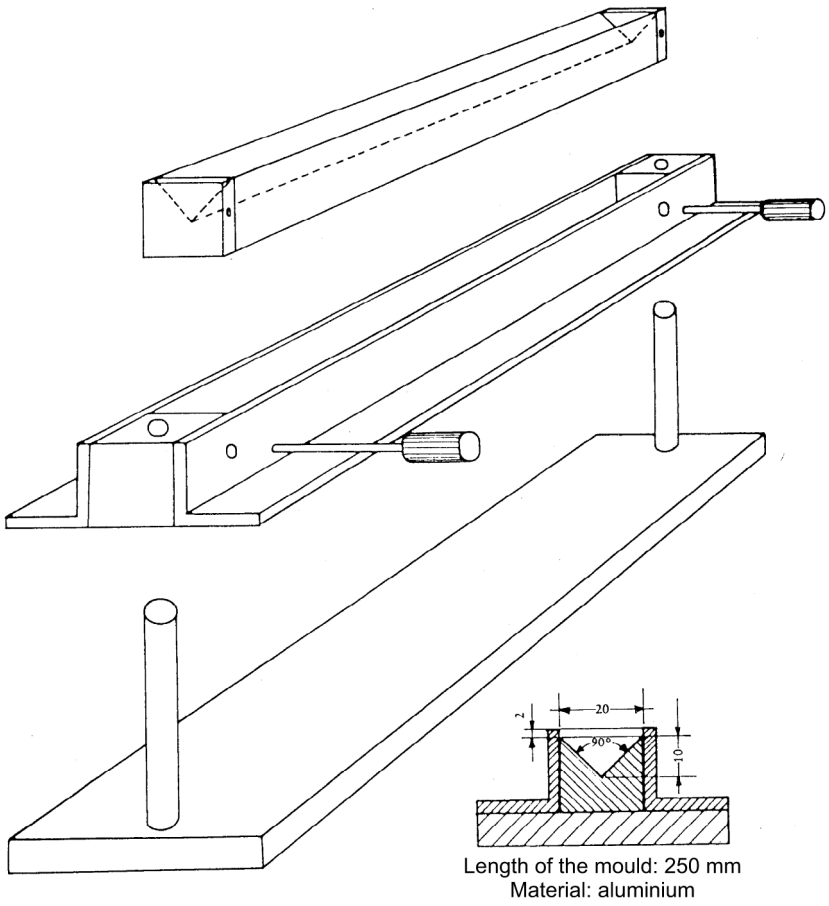
▼B

Appendiċi

Figura

Forma u aċċessorji għall-preparazzjoni tal-gozz

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



▼B

A.18. **IL-MEDJA TAL-PIŻ MOLEKULARI TAN-NUMRU U D-DISTRIBUZZJONI TAL-PIŻ MOLEKULARI TAL-POLIMERI**

1. **METODU**

Dan il-metodu Kromotografiku bil-Permeazzjoni tal-Ġel huwa replika tal-OECD TG 118 (1996). Il-prinċipji fundamentali u aktar informazzjoni teknika jinsabu fir-referenza 1.

1.1. DAĦLA

Ladarba l-proprjetajiet tal-polimeri huma daqshekk differenti, huwa impossibbli li jiġi deskritt metodu wieħed li jagħti l-kondizzjonijiet preċiżi għas-separazzjoni u l-valutazzjoni li japplikaw għal kull sitwazzjoni u għal kull ħaġa li tiġri waqt is-separazzjoni tal-polimeri. Partikolarment u ta' spiss, sistemi ta' polimeri komplessi mhumiex soġġetti għall-kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel (GPC). Meta l-GPC mhuwiex prattikabbli, l-piż molekulari jista' jiġi deċiż b'metodi oħrajn (ara l-Anness). F'dawn il-każijiet, għandhom jingħataw id-dettalji u l-ġustifikazzjonijiet kollha għall-metodu użat.

Il-metodu deskritt huwa bbażat fuq l-istandard DIN 55671 (1). F'dan l-istandard DIN tinsab informazzjoni dettaljata fuq kif għandhom jitmexxew dawn l-esperimenti u kif għandha tiġi vvalutata d-DATA. F'każ illi hemm bżonn li l-kondizzjonijiet ta' l-esperiment jinbidlu, dawn il-bidliet iridu jiġu ġustifikati. Jistgħu jintużaw standards oħrajn jekk ikun hemm ir-referenzi kollha. Il-metodu deskritt juża kampjuni tal-polisterin ta' politixrid magħruf għall-kalibrazzjoni, u jista' jagħti l-każ li jrid jiġi modifikat biex jaqbel ma' ċerti polimeri, eż. polimeri li jinħallu fl-ilma u polimeri *long-chain branched.*

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Il-medja tal-piż molekulari tan-numru M_n u l-medja tal-piż molekulari tal-piż M_w huma ddeterminati skond l-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

fejn,

H_i huwa l-livell tas-sinjal ta' osservazzjoni mil-linja ta' bażi għall-volum ta' retenzjoni V_i,

M_i huwa l-piż molekulari tal-frazzjoni tal-polimeri fil-volum ta' retenzjoni V_i, u

n huwa n-numru tal-punti ta' DATA.

Il-wisa' tad-distribuzzjoni tal-piż molekulari, li hija miżura tat-tixrid tas-sistema, tingħata bil-proporzjon M_w/M_n.

▼B

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Ladarba l-GPC huwa metodu relattiv, hemm bżonn ta' kalibrazzjoni. Normalment jintużaw standards tal-polistiren b'distribuzzjoni limitata u mibnija linearment u li għandhom piż molekulari medju M_n u M_w u distribuzzjoni ta' piż molekolari magħrufa. Il-kurva tal-kalibrazzjoni tista' tintuża biss fid-determinazzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun mhux magħruf jekk il-kondizzjonijiet għas-separazzjoni tal-kampjun u l-istandards intgħażlu b'mod preċiżament l-istess.

Ir-relazzjoni ddeterminata bejn il-piż molekulari u l-volum ta' elużjoni huwa validu biss taħt il-kondizzjonijiet speċifiċi ta' l-esperiment partikolari. Il-kondizzjonijiet fuq kollox jinkludu t-temperatura, s-solvent (jew taħlita tas-solventi), il-kondizzjonijiet tal-kromatografija u l-kolonna tas-separazzjoni jew is-sistemi tal-kolonni.

Il-piż molekulari tal-kampjuni ddeterminati b'dan il-mod huma valuri relattivi u huma deskritti bħala "piżijiet molekulari ekwivalenti għall-polistiren". Dan ifisser illi skond id-differenzi strutturali u kimiċi bejn il-kampjun u l-istandards, il-piżijiet molekulari jistgħu jiddevjaw mill-valuri assoluti sa grad iktar jew inqas. Jekk jintużaw standards oħrajn, eż. il-glikol tal-polietilin, l-ossidu tal-politin, il-metakrilat tal-polimetil, aċidu poliakriliku, għandha titniżżel ir-raġuni.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-EŻAMI

Kemm id-distribuzzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun kif ukoll il-piżijiet molekulari medji (M_n, M_w) jistgħu jiġu ddeterminati billi jintuża l-GPC. Il-GPC huwa metodu speċjali ta' kromatografija likwida fejn il-kampjun jiġi separat skond il-valuri idrodinamiċi tal-kostitwenti individwali (2).

Is-separazzjoni ssir kif il-kampjun jgħaddi minn ġo kolonna mimlija b'materjal poruż, tipikament ġel organiku. Molekoli żgħar jistgħu jippenetraw il-pori filwaqt li l-molekoli kbar ma jistgħux. Il-passaġġ tal-molekoli kbar huwa, għalhekk, iqsar u għalhekk huma jippenetraw l-ewwel. Il-molekoli ta'daqs medju jippenetraw minn uħud mill-pori u jgħaddu iktar tard. L-iżgħar molekoli, b'raġġ idrodinamiku medju iżgħar mill-pori tal-ġel jistgħu jippenetraw il-pori kollha. Dawn ikun eluż l-aħħar.

Idealment, is-separazzjoni hija ddeterminata biss skond id-daqs ta' l-ispeċi tal-molekoli, imma fil-prattika huwa diffiċli li wieħed jevita xi interferenza mill-assorbiment L-ippakkjar mhux ugwali tal-kolonni u volumi mejtin jistgħu jaggravaw is-sitwazzjoni (2).

L-osservazzjoni hija effetwata minn, eż. l-indiċi refrattiv jew l-assorbiment tal-UV u tagħti kurva tad-distribuzzjoni sempliċi. Madankollu, biex il-kurva tingħata valuri attwali tal-piż molekulari, huwa neċessarju li l-kolonna tiġi kkalibrata billi polimeri ta' piż molekulari magħruf u, idealment, ta' struttura simili ħafna, jitniżżlu 'l isfel, eż. standards tal-polistiren varji. B'mod tipiku, għandha tirriżulta kurva Gaussian, xi drabi mgħawwġa minħabba denb fuq in-naħa baxxa tal-piż molekulari, fejn il-fus vertikali jindika l-kwantità, skond il-piż, ta' l-ispeċi tal-piż molekulari varji, u l-fus orizzontali l-piż molekulari rreġistrat.

▼B

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ir-ripetibilità (Devjazzjoni ta' Livell Stabbilit: RSD) tal-volum ta' l-elużjoni għandha tkun aħjar minn 0,3 %. Ir-ripetibilità mixtieqa ta' l-analiżi għandha tiġi żgurata permezz ta' korrezzjoni skond standard intern jekk kromatogram huwa evalwat b'mod li huwa dipendenti fuq il-ħin u ma jaqbilx mal-kriterju msemmi hawn fuq (1). Il-politixrid jiddependi fuq il-piżijiet molekulari ta' l-istandards. Fil-każ ta' standards tal-polistirene, valuri tipiċi huma:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p huwa l-piż molekulari ta' l-istandard fil-quċċata tal-massimu)

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' L-EŻAMI

1.6.1. **Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet standard tal-polistiren**

L-istandards tal-polistiren għandhom jinħallu billi jitħalltu b'attenzjoni fl-eluwent magħżul. Ir-rakkomandazzjonijiet tal-fabbrikant għandhom jiġu kkunsidrati waqt il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet.

Il-konċentrazzjonijiet ta' l-istandards magħżula jiddependu fuq diversi fatturi: eż. il-volum ta' l-injezzjoni, il-viskożità tas-soluzzjoni u s-sensittività tad-ditekter analitiku. Il-volum massimu ta' l-injezzjoni għandu jiġi adattat għat-tul tal-kolonna biex tiġi evitata tagħbija żejda. Volumi ta' injezzjoni tipiċi għas-separazzjonijiet analitiċi bl-użu tal-GPC b'kolonna ta' 30 cm × 7,8 mm huma normalment bejn 40 u 100 µl. Volumi ogħla huma possibbli, imma m'għandhomx jaqbu 250 µl. L-aħjar proporzjon ta' bejn il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni għandha tiġi ddeterminata qabel ma tiġi kkalibrata l-kolonna.

1.6.2. **Preparazzjoni tal-kampjun tas-soluzzjoni**

Fil-prinċipju, l-istess ħtiġijiet japplikaw għall-preparazzjoni tal-kampjuni tas-soluzzjonijiet. Il-kampjun għandu jinħall f'solvent xieraq, eż. it-tetraidrofuran (THF), billi jitħawwad bil-galbu. Taħt l-ebda ċirkostanza m'għandu jinħall permezz ta' banju ultrasoniku. Fejn huwa neċessarju, il-kampjun tas-soluzzjoni għandu jiġi ppurifikat permezz ta' filtru tal-membrana b'pori ta' daqs bejn 0,2 u 2 µm.

Il-preżenza ta' partikoli li ma nħallux għanda titniżżel fir-rapport finali għar-raġuni li dawn jistgħu jirriżultaw minn speċi ta' piż molekulari għoli. Għandu jintuza metodu xieraq biex jiġi ddeterminat il-perċentaġġ skond il-piż tal-partikoli li nħallu. Is-soluzzjonijiet għandhom jintużaw fi-żmien 24 siegħa.

1.6.3. **L-apparat**

— ġibjuni tas-solventi:

— *degasser* (fejn xieraq),

— pompa

▼B

— apparat biex inaqqas l-impuls (fejn hemm bżonn)

— sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tal-kromatografija,

— ditekter

— *flowmeter* (fejn hemm bżonn),

— proċessur li jirrekordja d-DATA,

— kontenitur għall-iskart

Għandu jiġi żgurat li s-sistema GPC hija inerta fir-rigward tas-solventi użati (eż. bl-użu ta' kapillari ta' l-azzar għas-solvent THF).

1.6.4. **L-injezzjoni u s-sistema li twassal s-solventi**

Volum definit tal-kampjun tas-soluzzjoni jitgħabba fuq il-kolonna bl-użu ta' *auto-sampler* jew manwalment f'żona definita preċiżament. L-irtirar jew l-għafis tal-*plunger* tas-siringa b'mod mgħaġġel, jekk isir manwalment, jista' jikkawża bidliet fid-distribuzzjoni tal-piż molekulari osservata. Is-sistema tat-twassil tas-solvent għandha, safejn huwa possibbli, tkun ħielsa mill-impulsi u idealment għandha tinkludi apparat li jnaqqas l-impulsi. Il-*flowrate* tkun madwar 1 ml/min.

1.6.5. **Il-kolonna**

Skond il-kampjun, il-polimer ikun karatterizzat mill-użu ta' kolonna sempliċi jew minn numru ta' kolonni konnessi f'sekwenza. Għadd ta' materjali poruż tal-kolonni bi proprjetajiet definiti (eż. daqs tal-pori, limiti ta' esklużjoni) huma disponibbli kummerċjalment. L-għażla tal-ġel ta' separazzjoni jew tat-tul tal-kolonna jiddependi fuq il-proprjetajiet tal-kampjun (volumi idrodinamiċi, distribuzzjoni tal-piż molekulari) u l-kondizzjonijiet speċifiċi għas-separazzjoni bħas-solventi, t-temperatura u l-*flowrate* (1) (2) (3).

1.6.6. **Il-pjanċi teoretiċi**

Il-kolonna jew il-kombinazzjoni tal-kolonni użati għas-separazzjoni għandhom jiġu karatterizzati skond in-numru ta' pjanċi teoretiċi. Dan jinvolvi, f'każ meta t-THF huwa s- solvent eluwent, it-tagħbija ta' soluzzjoni ta' etile benżin jew ta' sustanza maħlula mhux b'polarità xierqa fuq kolonna ta' tul magħruf. In-numru ta' pjanċi teoretiċi huwa mogħti skond l-ekwazzjoni li ġejja:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{or} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

fejn,

N = in-numru tal-pjanċi teoretiċi

V_e = il-volum ta' elużjoni fil-quċċata tal-massimu

▼B

W = il-quċċata tal-wisa' tal-linja bażi

$W_{1/2}$ = il-quċċata tal-wisa' fin-nofs ta' l-għoli

1.6.7. **L-effiċjenza tas-separazzjoni**

Flimkien ma' l-ammont tal-pjanċi teoretiċi, li hija kwantità li tistabbilixxi il-*bandwidth*, l-effiċjenza tas-separazzjoni għandha sehem ukoll, u din hija stabbilita skond kemm hi wieqfa l-kurva tal-kalibrazzjoni. L-effiċjenza tas-separazzjoni ta' kolonna tinkisebskond irrelazzjoni li ġejja:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

fejn,

$V_{e,\ Mx}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari ta' għaxar darbiet iktar

Ir-riżoluzzjoni tas-sistema hija normalment definita kif ġej:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

fejn,

V_{e1}, V_{e2} = il-volumi ta' elużjoni taż-żewġ standards tal-polistiren fil-quċċata tal-massimu

W_1, W_2 = il-quċċata tal-wisat tal-linji ta' bażi

M_1, M_2 = il-piżijiet molekulari fil-quċċata tal-massimu (għandu jkun hemm differenza b' fattur ta' 10)

Il-valur R għas-sistema tal-kolonni għandu jkun ikbar minn 1.7 (4).

1.6.8. **Solventi**

Is-solventi kollha għandhom ikollhom purità għolja (għat-THF tintuża purità ta' 99,5 %). Id-depożitu tas-solventi (f'atmosfera ta' gass inert, jekk huwa neċessarju) għandu jkun kbir biżżejjed għall-kalibrazzjoni tal-kolonna u għal diversi analiżijiet tal-kampjuni. Il-gass għandu jitneħħa mis-solvent qabel ma jgħaddi għall-kolonna minn ġo pompa.

1.6.9. **Kontroll tat-temperatura**

It-temperatura tal-komponenti kruċjali interni (iċ-ċirku ta' injezzjoni (*injection loop*), il-kolonni, id-ditekter, u t-tubi) għandha tkun kostanti u konsistenti skond l-għażla tas-solvent.

▼B

1.6.10. **Ditekter**

Il-funzjoni tad-ditekter hija li jirreġistra b'mod kwantitattiv il-konċentrazzjoni tal-kampjun li ġie elwat mill-kolonna. Biex jiġi evitat li l-quċċati jitwessgħu, il-volum tal-*cuvette* taċ-ċellula tad-ditekter għandu jinżamm żgħir kemm jista' jkun. M'għandux ikun akbar minn 10 µl ħlief għal ditekters li jxerrdu d-dawl u għal ditekters tal-viskożità. Normalment tintuża rifrattometrija differenzjali għall-osservazzjoni. Madankollu, jekk meħtieġ mill-proprjetajiet speċifiċi tal-kampjun jew tas-solvent ta' elużjoni, jistgħu jintużaw ditekters oħrajn, eż. UV/VIS, IR, ditekters tal-viskożità, eċċ.

2. **DATA U RAPPURTAR**

2.1. DATA

L-istandard DIN (1) għandu jiġi kkonsultat għall-kriterji ta' valutazzjoni dettaljata kif ukoll għall-kondizzjonijiet għall-ġbir u għall-proċessar ta' DATA.

Għal kull kampjun għandhom isiru żewġ esperimenti indipendenti. Għandhom jiġu analizzati individwalment.

M_n, M_w, M_w/M_n u M_p għandhom jiġu pprovduti għal kull kejl. Huwa neċessarju li jiġi espliċitament indikat li l-valuri mkejla huma valuri relattivi ekwivalenti għall-piżijiet molekulari ta' l-istandard użat.

Wara li jiġu ddeterminati il-volumi ta' ritenzjoni jew il-ħinijiet ta' ritenzjoni (possibbilment irranġati permezz ta' standard intern), valuri log M_p (fejn M_p huwa l-massimu tal-quċċata ta' l-istandard tal-kalibrazzjoni) għandhom jitniżżlu ma' wieħed minn dawk il-kwantitajiet. Mill-inqas żewġ punti ta' kalibrazzjoni huma neċessarji għal kull sett ta' għaxar piżijiet molekulari, u mill-inqas ħames punti ta' kejl huma meħtieġa għall-kurva totali, u dan għandu jkopri l-piż molekulari stmat tal-kampjun. It-tarf baxx tal-kurva tal-kalibrazzjoni tal-piż molekulari huwa definit permezz ta' benżin *n-hexyl* jew sustanza maħlula mhux polari oħra.xierqa Il-medja tan-numru u l-medja tal-piż molekulari huma ġeneralment iddeterminati permezz ta' proċessar tad-DATA elettronika bbażata fuq il-formuli tas-sezzjoni 1.2. F'każ li tintuża d-diġitazzjoni manwali, ASTM D 3536-91 jista' jiġi kkonsultat (3).

Il-kurva tad-distribuzzjoni għandha tiġi pprovduta f'forma ta' tabella jew figura (frekwenza differenzjali jew persentaġġi tas-somom ma' log M). Fir-rappreżentazzjoni grafika, sett wieħed ta' għaxar piżijiet molekulari huwa normalment wiesa' 4 cm u l-massimu tal-quċċata għandu jkun twil xi 8 cm. F'każ ta' kurvi tad-distribuzzjoni integrali, d-differenza fil-koordinat bejn 0 u 100 % għandha tkun ta' xi 10 cm.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Sustanza tat-test**

— informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test (identità, addittivi, impuritajiet),

▼B

— deskrizzjoni tat-trattament tal-kampjun, osservazzjonijiet, problemi.

2.2.2. **Strumentazzjoni**

— kontenitur ta' l-eluwent, gass inert, tneħħija ta' gass żejjed ta' l-eluwent, kompożizzjoni ta' l-eluwent, impuritajiet,

— pompa, apparat li jnaqqas il-polz, sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tas-separazzjoni (il-fabbrikant, l-informazzjoni kollha dwar il-karatteristiċi tal-kolonni bħad-daqs tal-pori, it-tip ta' materjal ta' separazzjoni eċċ., in-numru, it-tul u l-ordni tal-kolonni użati),

— numru ta' pjanċi teoretiċi tal-kolonni (jew kombinazzjoni), effiċjenza tas-separazzjoni (riżoluzzjoni tas-sistema).

— informazzjoni dwar is-simetrija tal-quċċati,

— temperatura tal-kolonni, tip ta' kontroll tat-temperatura,

— indikatur (prinċipju tal-kejl, tip, *cuvette*, volum),

— *flowmeter* jekk użat (il-fabbrikant, il-prinċipju tal-kejl),

— sistema għar-reġistrazzjoni u proċessar tad-DATA (*hardware* u *software*)

2.2.3. **Kalibrazzjoni tas-sistema**

— deskrizzjoni dettaljata tal-metodu użat biex tinbena l-kurva tal-kalibrazzjoni,

— informazzjoni dwar il-kriterji ta' kwalità ta' dan il-metodu (eż. koeffiċjent tal-korrelazzjoni, *error sum of squares* eċċ.),

— informazzjoni dwar l-estrapolazzjonijiet, l-assunzjonijiet u l-approssimazzjonijiet li saru waqt il-proċedura esperimentali u l-valutazzjoni u l-proċessar tad-DATA,

— il-kejl kollu użat għall-kostruzzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni għandu jiġi dokumentat f'tabella li tinkludi l-informazzjoni li ġejja għal kull punt ta' kalibrazzjoni:

  — l-isem tal-kampjun,

  — il-fabbrikant tal-kampjun,

  — il-valuri karatteristiċi ta' l-istandards M_p, M_n, M_w u M_w/M_n, kif ipprovduti mill-fabbrikant jew kif miġjuba minn kejl sussegwenti, flimkien ma' dettalji dwar il-metodu ta' determinazzjoni,

  — il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni,

▼B

— il-valur M_p użat għall-kalibrazzjoni,

— il-valur ta' l-elużjoni jew il-ħin taż-żamma kkoreġut imkejjel fl-ogħla punt massimu,

— l-M_p kkalkulat fl-ogħla punt massimu,

— il-persentaġġ ta' żball ta' l-M_p kkalkulat u l-valur tal-kalibrazzjoni.

2.2.4. **Valutazzjoni:**

— valutazzjoni fuq bażi ta' ħin: il-metodi użati biex tkun żgurata r-riproduzzjoni meħtieġa (metodu ta' korrezzjoni, standard intern, eċċ.),

— informazzjoni dwar jekk l-istima ġietx affettwata fuq il-bażi tal-volum ta' l-elużjoni jew il-ħin taż-żamma,

— informazzjoni dwar il-limiti tal-valutazzjoni jekk quċċata mhijiex analizzata kompletament,

— deskrizzjoni ta' metodi li jneħħu x-xkiel, jekk użati,

— proċeduri ta' preparazzjoni u trattament minn qabel tal-kampjun,

— il-preżenza ta' partikoli mhux maħlulin, jekk hemm,

— il-volum ta' l-injezzjoni (µl) u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni (mg/ml),

— osservazzjonijiet li jindikaw effetti li jwasslu għal devjazzjonijiet mill-profil GPC ideali,

— deskrizzjoni dettaljata tal-modifikazzjonijiet kollha fil-proċeduri ta' l-ittestjar,

— dettalji ta' l-iskali ta' żbalji,

— kwalunkwe informazzjoni oħra u osservazzjonijiet rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati,

3. **REFERENZI**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., u Bly, D. D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Appendiċi

Eżempji ta' metodi oħra għad-determinazzjoni tal-piż numru medju molekulari (mn) għall-polimeri

Il-kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel (GPC) hija l-metodu preferut għad-determinazzjoni ta' M_n, speċjalment meta huwa disponibbli sett ta' standards, li l-istruttura tagħhom hija komparabbli ma' l-istruttura tal-polimer. Madankollu, fejn hemm diffikultajiet prattiċi fl-użu tal-GPC jew fejn diġà mistenni li s-sustanza ma tgħaddix mill-kriterju regolatorju M_n (u li jeħtieġ konferma), metodi alternattivi oħra huma disponibbli, bħal:

1. **Użu ta' Proprjetajiet Kolligativi**

1.1 Ebulljoskopija/Krijoskopija

tinvolvi l-kejl ta' l-elevazzjoni tat-temperatura tat-tgħolija (ebulljoskopija) jew id-depressjoni tat-temperatura ta' l-iffriżar (krijoskopija) ta' solvent, meta jiżdied il-polimer. Il-metodu huwa bbażat fuq il-fatt li l-effett tal-polimer maħlul fuq it-temperatura tat-tgħolija/ta' l-iffriżar tal-likwidu jiddependi fuq il-piż molekulari tal-polimer (1)(2).

Applikabilità, M_n < 20 000.

1.2 Tbaxxija tal-Pressjoni tal-Fwar

tinvolvi l-kejl tal-pressjoni tal-fwar minn likwidu ta' referenza magħżul qabel u wara ż-żieda ta' kwantitajiet magħrufa ta' polimer (1)(2).

Applikabilità, M_n < 20 000 (teoretikament; iżda fil-prattika ta' valur limitat).

1.3 L-Ożmometrija tal-Membrana

hija bbażata fuq il-prinċipju ta' l-ożmosi, i.e. it-tendenza naturali ta' molekuli solventi li jgħaddu minn membrana semi-permeabbli minn soluzzjoni dilwita għal soluzzjoni konċentrata biex jinkiseb l-ekwilibriju. Fit-test, is-soluzzjoni dilwita hija f'konċentrazzjoni żero, waqt li s-soluzzjoni konċentrata fiha l-polimer. L-effett tal-ġbid tas-solvent mill-membrana jikkawża differenzjal tal-pressjoni li huwa dipendenti fuq il-konċentrazzjoni u l-piż molekulari tal-polimer (1)(3)(4).

Applikabilità, M_n < 20 000 – 200 000.

1.4 Ożmometrija tal-Faži tal-Fwar.

tinvolvi l-paragun tar-rata ta' evaporazzjoni ta' *aerosol* tas-solvent pur ma' mill-anqas tliet *aerosols* li fihom il-polimer f'konċentrazzjonijiet varji (1)(5)(6) Applikabbiltà M_n < 20 000.

Analiżi tal-Grupp Terminali M_n < 20 000.

▼B

2. **Analiżi tal-Grupp Terminali**

Biex jintuża dan il-metodu, huwa meħtieġ għarfien kemm ta' l-istruttura komplessiva tal-polimer kif ukoll in-natura tal-gruppi terminali tal-katina (li jridu jkunu distinti mill-iskeletru ewlieni b'eż.. NMR jew titrazzjoni/derivatizzazzjoni). Id-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni molekulari tal-gruppi terminali preżenti fuq il-polimer tista' twassal għal valur għall-piż molekulari (7) (8) (9).

Applikabbiltà, M_n sa 50 000 (b'affidabilità li tonqos).

3. **Referenzi**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **KONTENUT TA' POLIMERI TA' PIŻ MOLEKULARI BAXX**

1. **METODU**

Dan il-metodu ta' kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel hu ripetizzjoni ta' l-OECD TG 119 (1996). Il-prinċipji fundamentali u iktar informazzjoni teknika jinsabu bħala riferenzi.

1.1. DAĦLA

Ladarba l-proprjetajiet tal-polimeri huma daqshekk varji, huwa impossibbli li jiġi deskritt metodu wieħed li jagħti l-kondizzjonijiet preċiżi għas-separazzjoni u l-valutazzjoni li japplikaw għal kull sitwazzjoni u għal kull ħaġa li tiġri waqt is-separazzjoni tal-polimeri. Ta' spiss u b'mod partikolari, sistemi ta' polimeri kumplessi mhumiex soġġetti għall-kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel (GPC). Meta il-GPC mhuwiex prattikabbli, il-piż molekulari jista' jiġi deċiż b'metodi oħrajn (ara l-Anness). F'dawn il-każijiet, għandhom jingħataw id-dettalji u l-ġustifikazzjonijiet kollha għall-użu ta' dak il-metodu.

Il-metodu deskritt huwa bbażat fuq l-istandard DIN 55671 (1). F'dan l-istandard DIN tinsab informazzjoni dettaljata fuq kif għandhom jitmexxew dawn l-esperimenti u kif għandha tiġi vvalutata d-DATA. F'każ illi hemm bżonn li l-kondizzjonijiet ta' l-esperiment jinbidlu, dawn il-bidliet iridu jiġu ġġustifikati. Jistgħu jintużaw standards oħrajn jekk ikun hemm ir-referenzi kollha. Il-metodu deskritt juża kampjuni tal-polisterin ta' politixrid magħruf għall-kalibrazzjoni, u jista' jagħti l-każ li jrid jiġi modifikat biex jaqbel ma' ċerti polimeri, eż. polimeri li jinħallu fl-ilma u polimeri *long-chain branched*.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Piż molekulari baxx huwa deskritt arbitrarjament bħala piż molekulari ta' inqas minn 1 000 dalton.

Il-medja tal-piż molekulari tan-numru M_n u l-medja tal-piż molekulari tal-piż M_w huma ddeterminati skond l-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

fejn,

H_I = il-livell tas-sinjal tad-ditekter mil-linji bażi għall-volum ta' retenzjoni V_i,

M_i = M_i huwa t-toqol molekulari tal-frazzjoni tal-polimeri fil-volum ta' retenzjoni V_i, u n huwa n-numru tal-punti tad-DATA.

Il-wisa' tad-distribuzzjoni tat-toqol molekulari, li hija miżura tat-tixrid tas-sistema, huwa mogħti bil-proporzjon M_w/M_n.

▼B

1.3. SUSTANZI TA' RIFERENZA

Ladarba l-GPC huwa metodu relattiv, hemm bżonn ta' kalibrazzjoni. Normalment jintużaw standards tal-polistiren b'distribuzzjoni limitata u mibnija linearment u li għandhom piż molekulari medju M_n u M_w u distribuzzjoni ta' piż molekolari magħrufa. Il-kurva tal-kalibrazzjoni tista' tintuża biss fid-determinazzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun mhux magħruf jekk il-kondizzjonijiet għas-separazzjoni tal-kampjun u l-istandards intgħażlu b'mod preċiżament l-istess.

Ir-relazzjoni ddeterminata bejn il-piż molekulari u l-volum ta' elużjoni huwa validu biss taħt il-kondizzjonijiet speċifiċi ta' l-esperiment partikolari. Il-kondizzjonijiet fuq kollox jinkludu t-temperatura, s-solvent (jew taħlita tas-solventi), il-kondizzjonijiet tal-kromatografija u l-kolonna tas-separazzjoni jew is-sistemi tal-kolonni.

Il-piż molekulari tal-kampjuni ddeterminati b'dan il-mod huma valuri relattivi u huma deskritti bħala "piżijiet molekulari ekwivalenti għall-polistiren". Dan ifisser illi skond id-differenzi strutturali u kimiċi bejn il-kampjun u l-istandards, il-piżijiet molekulari jistgħu jiddevjaw mill-valuri assoluti sa grad iktar jew inqas. Jekk jintużaw standards oħrajn, eż. il-glikol tal-polietilin, l-ossidu tal-politin, il-metakrilat tal-polimetil, aċidu poliakriliku, għandha titniżżel ir-raġuni.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-EŻAMINAZZJONI

Kemm id-distribuzzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun kif ukoll il-piżijiet molekulari medji (M_n, M_w) jistgħu jiġu ddeterminati billi jintuża l-GPC. Il-GPC huwa metodu speċjali ta' kromatografija likwida fejn il-kampjun jiġi separat skond il-valuri idrodinamiċi tal-kostitwenti individwali (2).

Is-separazzjoni ssir kif il-kampjun jgħaddi minn ġo kolonna mimlija b'materjal poruż, tipikament ġel organiku. Molekoli żgħar jistgħu jippenetraw il-pori filwaqt li l-molekoli kbar ma jistgħux. Il-passaġġ tal-molekoli kbar huwa, għalhekk, iqsar u għalhekk huma jippenetraw l-ewwel. Il-molekoli ta'daqs medju jippenetraw minn uħud mill-pori u jgħaddu iktar tard. L-iżgħar molekoli, b'raġġ idrodinamiku medju iżgħar mill-pori tal-ġel jistgħu jippenetraw il-pori kollha. Dawn ikun eluża l-aħħar.

Idealment, is-separazzjoni hija ddeterminata biss skond id-daqs ta' l-ispeċi tal-molekoli, imma fil-prattika huwa diffiċli li wieħed jevita xi interferenza mill-assorbiment L-ippakkjar mhux ugwali tal-kolonni u volumi mejtin jistgħu jaggravaw is-sitwazzjoni (2).

L-osservazzjoni hija effetwata minn, eż. l-indiċi refrattiv jew l-assorbiment tal-UV u tagħti kurva tad-distribuzzjoni sempliċi. Madankollu, biex il-kurva tingħata valuri attwali tal-piż molekulari, huwa neċessarju li l-kolonna tiġi kkalibrata billi polimeri ta' piż molekulari magħruf u, idealment, ta' struttura simili ħafna, jitniżżlu 'l isfel, eż. standards tal-polistiren varji. B'mod tipiku, għandha tirriżulta kurva Gaussian, xi drabi mgħawwġa minħabba denb fuq in-naħa baxxa tal-piż molekulari, fejn il-fus vertikali jindika l-kwantità, skond il-piż, ta' l-ispeċi tal-piż molekulari varji, u l-fus orizzontali l-piż molekulari rreġistrat.

▼B

Il-kontenut tal-piż molekulari baxx huwa derivat minn din il-kurva. Il-kalkolu jista' jkun eżatt biss jekk l-ispeċi ta' piż molekulari baxx iġibu ruħhom bl-istess mod fuq bażi ta' piż għall-polimer sħiħ.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ir-ripetibilità (Devjazzjoni ta' Standard Relattiv: RSD) tal-volum ta' l-elużjoni għandha tkun aħjar minn 0,3 %. Ir-ripetibilità mixtieqa ta' l-analiżi għandha tiġi żgurata permezz ta' korrezzjoni skond standard intern jekk kromatogram huwa evalwat b'mod li huwa dipendenti fuq il-ħin u ma jaqbilx mal-kriterju msemmi hawn fuq (1). Il-politixrid jiddependi fuq il-piżijiet molekulari ta' l-istandards. Fil-każ ta' standards tal-polisterin, valuri tipiċi huma:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p huwa l-piż molekulari ta' l-istandard fil-quċċata tal-massimu)

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' L-EŻAMINAZZJONI

1.6.1. **Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet standard tal-polistirene**

L-istandards tal-polisterin huma maħlula permezz ta' taħlit bil-galbu fl-eluwent magħżul. Ir-rakkomandazzjonijiet tal-fabbrikant għandhom jiġu kkunsidrati waqt il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet.

Il-konċentrazzjonijiet ta' l-istandards li ntagħżlu huma dipendenti fuq fatturi varji, eż. il-volum ta' injezzjoni, il-viskożità tas-soluzzjoni u s-sensittività ta' l-indikatur analitiku. Il-volum massimu ta' injezzjoni għandu jiġi adattat għat-tul tal-kolonna, sabiex tiġi evitata t-tagħbija żejda. Il-volumi tipiċi ta' injezzjoni għal separazzjonijiet analitiċi bl-użu ta' GPC b'kolonna ta' 30 cm × 7,8 mm huma normalment bejn 40 u 100 µl. Volumi ogħla huma possibbli, imma m'għandhomx ikunu aktar minn 250 µl. L-aħjar proporzjon ta' volum ta' injezzjoni ma' konċentrazzjoni għandha tiġi ddeterminata qabel il-kalibrazzjoni attwali tal-kolonna.

1.6.2. **Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun**

Bħala prinċipju, l-istess ħtiġijiet japplikaw għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-kampjun. Il-kampjun hu maħlul f'solvent xieraq, e.g. tetraidrofuran (THF), billi jitħawwad bil-galbu. Taħt l-ebda ċirkustanzi m'għandu jiġi maħlul permezz ta' banju ultrasoniku. Meta meħtieġ, is-soluzzjoni tal-kampjun hija ppurifikata permezz ta' filtru tal-membrana b'daqs tal-pori ta' bejn 0,2 u 2 µm.

Il-preżenza ta' partikoli mhux maħlula għandha tiġi rreġistrata fir-rapport finali peress li dawn jistgħu jkunu minħabba speċi ta' piż molekulari għoli. Metodu xieraq għandu jintuża' biex jiġi ddeterminat il-persentaġġ f'piż tal-partikoli mhux maħlula. Is-soluzzjonijiet għandhom jintużaw fi żmien 24 siegħa.

▼B

1.6.3. **Korrezzjoni għal kontenut ta' impuritajiet u addittivi**

Korrezzjoni tal-kontenut ta' speċi ta' M < 1 000 għall-kontribuzzjoni minn komponenti speċifiċi mhux polimeri preżenti (eż. impuritajiet u/jew addittivi) hija ġeneralment meħtieġa, sakemm il-kontenut imkejjel mhux diġà <1 %. Dan jinkiseb permezz ta' analiżi diretta tas-soluzzjoni polimera jew l-elużjoni GPC.

F'każijiet fejn l-elużjoni, wara passaġġ mill-kolonna, hija wisq dilwita għal analiżi ulterjuri, din għandha tiġi kkonċentrata. Jista' jkun hemm il-ħtieġa li l-elużjoni tiġi evaporata san-nixfa u maħlula mill-ġdid. Konċentrazzjoni ta' l-elużjoni għandha tiġi miksuba taħt kondizzjonijiet li jassiguraw li l-ebda bidliet ma jseħħu fl-elużjoni. It-trattament ta' l-elużjoni wara l-pass tal-GPC hu dipendenti fuq il-metodu analitiku użat għad-determinazzjoni kwantitattiva.

1.6.4. **Apparat**

L-apparat GPC jinkludi l-komponenti li ġejjin:

— reservoir tas-solventi,

— *degasser* (fejn hemm bżonn),

— pompa,

— apparat li jnaqqas l-impuls (fejn hemm bżonn),

— sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tal-kromatografija,

— indikatur,

— *flowmeter* (fejn hemm bżonn)

— reġistratur-proċessur tad-data,

— reċipjent għall-iskart.

Għandu jiġi żgurat li s-sistema GPC hija inerta fir-rigward tas-solventi użati (eż. bl-użu ta' kapillari ta' l-azzar għas-solvent THF).

1.6.5. **L-injezzjoni u s-sistema li twassal s-solventi**

Volum definit tal-kampjun tas-soluzzjoni jitgħabba fuq il-kolonna bl-użu ta' *auto-sampler* jew manwalment f'żona definita preċiżament. L-irtirar jew l-għafis tal-*plunger* tas-siringa b'mod mgħaġġel, jekk isir manwalment, jista' jikkawża bidliet fid-distribuzzjoni tal-piż molekulari osservata. Is-sistema tat-twassil tas-solvent għandha, safejn huwa possibbli, tkun ħielsa mill-impulsi u idealment għandha tinkludi apparat li jnaqqas l-impulsi. Il-*flowrate* tkun madwar 1 ml/min.

1.6.6. **Il-kolonna**

Skond il-kampjun, il-polimer ikun karatterizzat mill-użu ta' kolonna sempliċi jew minn numru ta' kolonni konnessi f'sekwenza. Għadd ta' materjali poruż tal-kolonni bi proprjetajiet definiti (eż. daqs tal-pori, limiti ta' esklużjoni) huma disponibbli kummerċjalment. L-għażla tal-ġel ta' separazzjoni jew tat-tul tal-kolonna jiddependi fuq il-proprjetajiet tal-kampjun (volumi idrodinamiċi, distribuzzjoni tal-piż molekulari) u l-kondizzjonijiet speċifiċi għas-separazzjoni bħas-solventi, t-temperatura u l-*flowrate* (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Il-pjanċi teoretiċi**

Il-kolonna jew il-kombinazzjoni tal-kolonni użati għas-separazzjoni għandhom jiġu karatterizzati skond in-numru ta' pjanċi teoretiċi. Dan jinvolvi, f'każ meta t-THF huwa s- solvent eluwent, it-tagħbija ta' soluzzjoni ta' etile benżin jew ta' sustanza maħlula mhux b'polarità xierqa fuq kolonna ta' tul magħruf. In-numru ta' pjanċi teoretiċi huwa mogħti skond l-ekwazzjoni li ġejja:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{or} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

fejn,

N = in-numru tal-pjanċi teoretiċi

V_e = il-volum ta' elużjoni fil-quċċata tal-massimu

W = il-quċċata tal-wisa' tal-linja bażi

$W_{1/2}$ = il-quċċata tal-wisa' fin-nofs ta' l-għoli

1.6.8. **L-effiċjenza tas-separazzjoni**

Flimkien ma' l-ammont tal-pjanċi teoretiċi, li hija kwantità li tist-abbilixxi il-*bandwidth*, l-effiċjenza tas-separazzjoni għandha sehem ukoll, u din hija stabbilita skond kemm hi wieqfa l-kurva tal-kali-brazzjoni. L-effiċjenza tas-separazzjoni ta' kolonna tinkisebskond ir-relazzjoni li ġejja:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

fejn,

$V_{e,\,M_x}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari ta' għaxar darbiet iktar

Ir-riżoluzzjoni tas-sistema hija normalment definita kif ġej:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

fejn,

V_{e1}, V_{e2} = il-volumi ta' elużjoni taż-żewġ standards tal-polistiren fil-quċċata tal-massimu

W_1, W_2 = il-quċċata tal-wisat tal-linji ta' bażi

M_1, M_2 = il-piżijiet molekulari fil-quċċata tal-massimu (għandu jkun hemm differenza b' fattur ta' 10)

Il-valur R għas-sistema tal-kolonni għandu jkun ikbar minn 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solventi**

Is-solventi kollha għandhom ikollhom purità għolja (għat-THF tintuża purità ta' 99,5 %). Id-depożitu tas-solventi (f'atmosfera ta' gass inert, jekk huwa neċessarju) għandu jkun kbir biżżejjed għall-kalibrazzjoni tal-kolonna u għal diversi analiżijiet tal-kampjuni. Il-gass għandu jitneħħa mis-solvent qabel ma jgħaddi għall-kolonna minn ġo pompa.

1.6.10. **Kontroll tat-temperatura**

It-temperatura tal-komponenti kruċjali interni (iċ-ċirku ta' injezzjoni (*injection loop*), il-kolonni, id-ditekter, u t-tubi) għandha tkun kostanti u konsistenti skond l-għażla tas-solvent.

1.6.11. **Ditekter**

Il-funzjoni tad-ditekter hija li jirreġistra b'mod kwantitattiv il-konċentrazzjoni tal-kampjun li ġie elwat mill-kolonna. Biex jiġi evitat li l-quċċati jitwessgħu, il-volum tal-*cuvette* taċ-ċellula tad-ditekter għandu jinżamm żgħir kemm jista' jkun. M'għandux ikun akbar minn 10 µl ħlief għal diteketers li jxerrdu d-dawl u għal diteketers tal-viskożità. Normalment tintuża rifrattometrija differenzjali għall-osservazzjoni. Madankollu, jekk meħtieġ mill-proprjetajiet speċifiċi tal-kampjun jew tas-solvent ta' elużjoni, jistgħu jintużaw diteketers oħrajn, eż. UV/VIS, IR, diteketers tal-viskożità, eċċ.

2. **DATA U RAPPURTAR**

2.1. DATA

L-istandard DIN (1) għandu jiġi kkonsultat għall-kriterji ta' valutazzjoni dettaljata kif ukoll għall-kondizzjonijiet għall-ġbir u għall-proċessar ta' DATA.

Għal kull kampjun għandhom isiru żewġ esperimenti indipendenti. Għandhom jiġu analizzati individwalment. Fil-każijietjiet kollha hu essenjzali li tiġi ddeterminata wkoll DATA minn *blanks*, ittrattati taħt l-istess kondizzjonijiet tal-kampjun.

Huwa meħtieġ li jiġi indikat b'mod espliċitu li l-valuri mkejla huma valuri relattivi ekwivalenti għall-piż molekulari ta' l-istandard użat.

Wara determinazzjoni tal-volumi taż-żamma jew tal-ħinijiet taż-żamma (possibilment ikkoreġuti bl-użu ta' standard intern), valuri log M_p (M_p meqjus bħala l-ogħla quċċata ta' l-istandard tal-kalibrazzjoni) jitniżżlu ħdejn waħda minn dawn il-kwantitajiet. Mill-inqas żewġ punti ta' kalibrazzjoni huma meħtieġa għal kull sett ta' għaxaa piżijiet molekulari, u mill-inqas ħames punti ta' kejl huma meħtieġa għall-kurva totali, li għandha tkopri l-piż molekulari stmat għall-kampjun. Il-punt ta' tmiem baxx tal-piż molekulari tal-kurva ta' kalibrazzjoni huwa mfisser minn *n-hexyl* benżin jew minn soluzzjonimaħlula mhux polari oħra xierqa. Il-porzjon tal-kurva li jikkorrispondi għall-piż molekulari taħt 1 000 huwa ddeterminat u kkoreġut kif meħtieġ għall-impuritajiet u l-additttivi. Il-kurvi ta' l-elużjoni huma ġeneralment stmati permezz ta' l-ipproċessar elettroniku tad-DATA. Fil-każ li tintuża diġitazzjoni manwali, ASTM D 3536-91 jista' jiġi kkonsultat (3).

▼B

Jekk kwalunkwe polimer li ma jinħallx jinżamm fil-kolonna, il-piż molekulari tiegħu x'aktarx li jkun ogħla minn dak tal-frazzjoni li tinħall, u jekk ma jiġix ikkunsidrat jista' jirriżulta fi stima eċċessiva tal-kontenut tal-piż molekulari baxx. Gwida għall-korrezzjoni tal-kontenut tal-piż molekulari baxx għall-polimer li ma jinħallx hija prevista fl-Anness.

Il-kurva tad-distribuzzjoni għandha tiġi pprovduta f'forma ta' tabella jew figura (frekwenza differenzjali jew persentaġġi tas-somom ma' log M). Fir-rappreżentazzjoni grafika, sett wieħed ta' għaxar piżijiet molekulari huwa normalment wiesa' 4 cm u l-massimu tal-quċċata għandu jkun twil xi 8 cm. F'każ ta' kurvi tad-distribuzzjoni integrali, d-differenza fil-koordinat bejn 0 u 100 % għandha tkun ta' xi 10 cm.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Sustanza tat-test**

— informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test (identità, addittivi, impuritajiet),

— deskrizzjoni tat-trattament tal-kampjun, osservazzjonijiet, problemi.

2.2.2. **Strumentazzjoni**

— kontenitur ta' l-eluwent, gass inert, tneħħija ta' gass żejjed ta' l-eluwent, kompożizzjoni ta' l-eluwent, impuritajiet,

— pompa, apparat li jnaqqas il-polz, sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tas-separazzjoni (il-fabbrikant, l-informazzjoni kollha dwar il-karatteristiċi tal-kolonni bħad-daqs tal-pori, it-tip ta' materjal ta' separazzjoni eċċ., in-numru, it-tul u l-ordni tal-kolonni użati),

— numru ta' pjanċi teoretiċi tal-kolonni (jew kombinazzjoni), effiċjenza tas-separazzjoni (riżoluzzjoni tas-sistema).

— informazzjoni dwar is-simetrija tal-quċċati,

— temperatura tal-kolonni, tip ta' kontroll tat-temperatura,

— indikatur (prinċipju tal-kejl, tip, *cuvette*, volum),

— *flowmeter* jekk użat (il-fabbrikant, il-prinċipju tal-kejl),

— sistema għar-reġistrazzjoni u proċessar tad-DATA (*hardware* u *software*)

2.2.3. **Kalibrazzjoni tas-sistema**

— deskrizzjoni dettaljata tal-metodu użat biex tinbena l-kurva tal-kalibrazzjoni,

▼B

— informazzjoni dwar il-kriterji ta' kwalità ta' dan il-metodu (eż. koeffiċjent tal-korrelazzjoni, *error sum of squares* eċċ.),

— informazzjoni dwar l-estrapolazzjonijiet, l-assunzjonijiet u l-approssimazzjonijiet li saru waqt il-proċedura esperimentali u l-valutazzjoni u l-proċessar tad-DATA,

— il-kejl kollu użat għall-kostruzzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni għandu jiġi dokumentat f'tabella li tinkludi l-informazzjoni li ġejja għal kull punt ta' kalibrazzjoni:

  — l-isem tal-kampjun,

  — il-fabbrikant tal-kampjun,

  — il-valuri karatteristiċi ta' l-istandards M_p, M_n, M_w u M_w/M_n, kif ipprovduti mill-fabbrikant jew kif miġjuba minn kejl sussegwenti, flimkien ma' dettalji dwar il-metodu ta' determinazzjoni,

  — il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni,

  — il-valur M_p użat għall-kalibrazzjoni,

  — il-valur ta' l-elużjoni jew il-ħin taż-żamma kkoreġut imkejjel fl-ogħla punt massimu,

  — l-M_p kkalkulat fl-ogħla punt massimu,

  — il-persentaġġ ta' żball ta' l-M_p kkalkulat u l-valur tal-kalibrazzjoni.

2.2.4. **Informazzjoni dwar il-kontenut polimeru ta' piż molekulari baxx**

— deskrizzjoni tal-metodi użati fl-analiżi u l-mod li bih twettqu l-esperimenti;

— informazzjoni dwar il-persentaġġ ta' kontenut ta' speċi ta' piż molekulari baxx (w/w) relatat mal-kampjun totali,

— informazzjoni dwar impuritajiet, addittivi u speċi oħra mhux polimeri f'persentaġġ f'piż relatat mal-kampjun totali.

2.2.5. **Valutazzjoni:**

— valutazzjoni fuq bażi ta' ħin: il-metodi użati biex tkun żgurata r-riproduzzjoni meħtieġa (metodu ta' korrezzjoni, standard intern, eċċ.),

— informazzjoni dwar jekk l-istima ġietx affettwata fuq il-bażi tal-volum ta' l-elużjoni jew il-ħin taż-żamma,

— informazzjoni dwar il-limiti tal-valutazzjoni jekk quċċata mhijiex analizzata kompletament,

— deskrizzjoni ta' metodi li jneħħu x-xkiel, jekk użati,

— proċeduri ta' preparazzjoni u trattament minn qabel tal-kampjun,

— il-preżenza ta' partikoli mhux maħlulin, jekk hemm,

▼B

— il-volum ta' l-injezzjoni (µl) u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni (mg/ml),

— osservazzjonijiet li jindikaw effetti li jwasslu għal devjazzjonijiet mill-profil GPC ideali,

— deskrizzjoni dettaljata tal-modifikazzjonijiet kollha fil-proċeduri ta' l-ittestjar,

— dettalji ta' l-iskali ta' żbalji,

— kwalunkwe informazzjoni oħra u osservazzjonijiet rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati,

3. **REFERENZI**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Appendiċi

Gwida għall-korrezzjoni tal-kontenut molekulari baxx għall-preżenza ta' polimeri insolubbli

Meta hemm polimer insolubbli f'kampjun, dan jirriżulta f'telf tal-piż matul l-analiżi GPC. Il-polimer insolubbli jinżamm b'mod irriversibbli fuq il-kolonna jew il-filtru tal-kampjun waqt li l-porzjon solubbli tgħaddi mill-kolonna. Fil-każ fejn iż-żieda fl-indiċi rifrattiva (dn/dc) tal-polimer tista' tkun stmata jew imkejla, wieħed jista' jistma' l-piż tal-kampjun mitluf fuq il-kolonna. F'dak il-każ, wieħed jagħmel korrezzjoni bl-użu ta' kalibrazzjoni esterna b'materjali standard ta' konċentrazzjoni magħrufa u dn/dc magħruf sabiex ikun ikkalibrat ir-reazzjoni tar-rifrattometru. Fl-eżempju hawn taħt jintuża standard *poly*(*methyl methacrylate)* (pMMA).

Fil-kalibrazzjoni esterna għall-analiżi ta' polimeri akriliċi, standard pMMA ta' konċentrazzjoni magħrufa fit-tetraidrofuran, jiġi analizzat bil-GPC u d-data li tirriżulta tintuża biex jinsab il-kostanti tar-rifrattometru skond l-ekwazzjoni:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

fejn:

K = il-kostanti tar-rifrattometru (f'microvolt second/ml),

R = it-tweġiba ta' l-istandard pMMA (f'microvolt/second),

C = il-konċentrazzjoni ta' l-istandard pMMA (f'mg/ml),

V = il-volum ta' l-injezzjoni (f'ml) u

dn/dc = iż-żieda fl-indiċi rifrattiv għall-pMMA f'tetraidrofuran (f'ml/mg).

The following data are typical for a pMMA standard:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Il-valur K li jirriżulta, $3{,}05 \times 10^{11}$ imbagħad jintuża biex tkun ikkalkulata r-reazzjoni teoretika tad-ditekter jekk 100 % tal-polimer injettat kien elwat permezz tad-ditekter.

▼B

A.20. **L-IMĠIBA TAS-SOLUZZJONI/TA' L-ESTRAZZJONI TA' POLIMERI FL-ILMA**

1. **METODU**

Il-metodu deskritt huwa repetizzjoni tal-verżjoni reveduta ta' l-OECD TG 120 (1997). Aktar informazzjoni teknika tingħata bħala referenza (1).

1.1. DAĦLA

Għal ċerti polimeri, bħall-polimeri ta' emulsjoni, xogħol ta' preparazzjoni inizjali jista' jkun meħtieġ qabel ma jista' jintuża' l-metodu stabbilit minn hawn 'il quddiem. Il-metodu mhuwiex applikabbli għal polimeri likwidi u għal polimeri li jirreaġixxu ma' l-ilma taħt il-kondizzjonijiet ta' l-ittestjar.

Meta l-metodu mhuwiex prattiku jew mhuwiex possibbli, l-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tista' tiġi investigata permezz ta' metodi oħrajn. F'każijiet bħal dawn, dettalji sħaħ u ġustifikazzjoni sħiħa għandhom jingħataw għall-metodu użat.

1.2. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

L-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni ta' polimeri f'sustanza ta' l-ilma hija ddeterminata bl-użu tal-metodu tal-flixkun (ara A.6 is-solubilità fl-ilma, metodu tal-flixkun) bil-modifikazzjonijiet deskritti hawn taħt.

1.4. KRITERJI TA' KWALITÀ

Xejn.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

1.5.1. **Apparat**

L-apparat li ġej hu meħtieġ għall-metodu:

— mezz ta' tifrik, eż. mola għall-produzzjoni ta' partikoli ta' daqs magħruf,

— apparat għat-tħawwid bil-possibiltà ta' kontroll tat-temperatura,

— sistema ta' l-iffiltrar tal-membrana,

— apparat analitiku xieraq,

— għarbiela standardizzati.

1.5.2. **Preparazzjoni tal-kampjun**

Kampjun rappreżentattiv għandu l-ewwel jitnaqqas sa daqs ta' partikolu bejn 0,125 u 0,25 mm bl-użu ta' għarbiela xierqa. Jista' jkun meħtieġ tkessiħ għall-istabbilità tal-kampjun jew għall-proċess tad-tħin. Materjali ta' natura li tixbah il-lastiku jistgħu jitfarrku fit-temperatura tan-nitroġenu likwidu (1).

Jekk il-frazzjon tad-daqs tal-partikolu meħtieġ ma jistax jinkiseb, għandha tittieħed azzjoni biex kemm jista' jkun jitnaqqas id-daqs tal-partikoli u r-riżultat jiġi rrappurtat. Fir-rapport, huwa meħtieġ li jiġi indikat il-mod li bih il-kampjun imfarrak kien maħżun qabel it-test.

▼B

1.5.3. **Proċedura**

Tliet kampjuni ta' 10g tas-sustanza tat-test jintiżnu f'kull wieħed minn tliet kontenituri li għandhom *stopper* tal-ħġieġ u jiżdiedu 1 000 ml ta' ilma f'kull kontenitur. Jekk it-trattament ta' ammont ta' polimeru ta' 10 g jidher li mhuwiex prattikabbli, l-ogħla ammont li jmiss li jista' jiġi ttrattat għandu jintuża' u l-volum ta' ilma jiġi aġġustat skond dan.

Stoppers jitqiegħdu fuq il-kontenituri u jiġu ssikkati u mbgħad jitħawdu f'temperatura ta' 20 °C. Għandu jintuża apparat ta' ċaqliq jew tħawwid li kapaċi jaħdem f'temperatura kostanti. Wara perjodu ta' 24 siegħa, il-kontenut ta' kull kontenitur huwa ċċentrifugat u ffiltrat u l-konċentrazzjoni ta' polimer fil-fażi ċara ta' l-ilma hija ddeterminata permezz ta' metodu analitiku xieraq. Jekk metodi analitiċi xierqa għall-fażi ta' l-ilma mhumiex disponibbli, is-solubilità/l-estrattività totali tista' tiġi stmata mill-piż niexef tar-residwu tal-filtru jew tal-preċipitat iċċentrifugat.

Is-soltu ikun hemm il-ħtieġa li jkun hemm differenza kwantitattiva bejn l-impuritajiet u l-addittivi min-naħa l-waħda u l-ispeċi ta' piż molekulari baxx min-naħa l-oħra. Fil-każ ta' determinazzjoni gravimetrika, huwa importanti wkoll li titwettaq prova blank mingħajr sustanza għat-test sabiex jinkiseb għarfien dwar residwi li ġejjin mill-proċedura esperimentali.

L-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni ta' polimeri fl-ilma f'temperatura ta' 37 °C f'pH 2 u pH 9 tista' tiġi ddeterminata bl-istess mod kif deskritt fit-twettiq ta' l-esperiment f`temperatura ta' 20 °C. Il-valuri tal-pH jistgħu jinkisbu biż-żieda jew sustanzi ta' protezzjoni xierqa jew ta' aċidi jew ta' bażi xierqa bħal aċidu idrokloriku, aċidu aċetiku, sodju ta' grad analitiku jew idrossidu tal-potassju jew NH_3.

Skond il-metodu ta' analiżi użat, għandhom jitwettqu test wieħed jew żewġ testijiet. Meta metodi speċifiċi biżżejjed ikunu disponibbli għall-analiżi diretta tal-fażi ta' l-ilma għall-komponent tal-polimer, test wieħed kif deskritt hawn fuq għandu jkun biżżejjed. Madankollu, meta dawn il-metodi mhumiex disponibbli u d-determinazzjoni ta' l-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tal-polimer hija limitata għall-analiżi indiretta billi jiġi iddeterminat biss il-kontenut totali ta' karbonju organiku (TOC) ta' l-estratt ta' l-ilma, test addizzjonali għandu jitwettaq. Dan it-test addizzjonali għandu wkoll jsir tliet darbiet, bl-użu ta' kampjuni ta' polimeri li huma 10 darbiet iżgħar u bl-istess ammonti ta' ilma użati fl-ewwel test.

1.5.4. **Analiżi**

1.5.4.1. *Test imwettaq b'daqs wieħed ta' kampjun*

Jista' jkun hemm metodi disposnibbli għall-analiżi diretta ta' komponenti polimeri fil-fażi ta' l-ilma. Inkella, analiżi indiretta ta' komponenti polimeri maħlula/estratti, permezz tad-determinazzjoni tal-kontenut totali ta' partijiet li jinħallu u l-korrezzjoni għal komponenti polimeri mhux speċifiċi, tista' wkoll tiġi kkunsidrata.

Analiżi tal-fażi ta' l-ilma għall-ispeċi polimerika totali hija possibbli:

jew permezz ta' metodu sensittiv biżżejjed, eż.

— TOC li tuża diġestjoni ta' persulfat jew dikromata biex tagħti CO_2 segwita bi stima permezz ta' IR jew ta' analiżi kimika,

▼B

— spettrometrija atomika ta' l-assorbiment (AAS) jew l-emissjoni tal-plasma tagħha magħquda b'mod induttiv (ICP) ekwivalenti għal silikone jew polimer li jkun fih il-metall,

— assorbiment ta' l-UV jew spettrofluworimetrija għall-polimeri *aryl*,

— LC-MS għal kampjuni ta' piż molekulari baxx.

jew permezz ta' evaporazzjoni b'vakwu san-nixfa ta' l-estratt ta' l-ilma u analiżi spettroskopika (IR, UV, eċċ.) jew AAS/ICP tar-residwu.

Jekk analiżi tal-fażi ta' l-ilma fiha nnifisha mhijiex prattikabbli, l-estratt ta' l-ilma għandu jiġi estratt b'solvent organiku li ma jistax jitħallat ma' l-ilma, eż. idrokarbonju klorinat. Is-solvent huwa mbagħad evaporat u r-residwu huwa analizzat kif imsemmi hawn fuq għall-kontenut polimeru notifikat. Kwalunkwe komponenti f'dan ir-residwu li huma identifikati bħala impuritajiet jew addittivi għandhom jitnaqqsu għall-iskop tad-determinazzjoni tal-grad ta' soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tal-polimer nnifsu.

Meta kwantitajiet relattivament kbar ta' dawn il-materjali huma preżenti, jista' jkun meħtieġ li r-residwu jiġi soġġett għal, eż. analiżi HPLC jew GC biex jiġu differenzjati l-impuritajiet preżenti li ġejjin mill-ispeċi monomeri jew li ġejjin mill-monomeri sabiex il-kontenut veru ta' dawn ta' l-aħħar jista' jiġi ddeterminat.

F'xi każijiet, jista' jkun suffiċjenti li ssir evaporazzjoni sempliċi tas-solvent organiku san-nixfa u li jintiżen ir-residwu niexef.

1.5.4.2. *Test imwettaq b'żewġ daqsijiet differenti ta' kampjun*

L-estratti ta' l-ilma kollha huma analizzati għat-TOC.

Determinazzjoni gravimetrika titwettaq fuq il-parti mhux maħlula/-mhux estratta tal-kampjun. Jekk, wara ċ-ċentrifugazzjoni jew l-iffiltrar tal-kontenut ta' kull kontenitur, residwi polimeri jibqgħu mwaħħlin mal-ħajt tal-kontenitur, il-kontenitur għandu jitlaħlaħ bil-filtrat sa kemm il-kontenitur jitnaddaf mir-residwi viżibbli kollha. Wara dan, il-filtrat huwa ċċentrifugat jew iffiltrat għal darb'oħra. Ir-residwi li jibqgħu fuq il-filtru jew fit-tubu taċ-ċentrifugu jitnixxfu f'temperatura ta' 40 °C taħt vakwu u jintiżnu. It-tnixxif jitkompla sakemm jintlaħaq piż kostanti.

2. **DATA**

2.1. TEST IMWETTAQ B'DAQS WIEĦED TAL-KAMPJUN

Ir-riżultati individwali għal kull wieħed mit-tliet fliexken u l-valuri medji għandhom jingħataw u għandhom ikunu espressi f'unitajiet ta' piż għal kull volum tas-soluzzjoni (tipikament mg/l) jew piż għal kull piż ta' kampjun tal-polimeru (tipikament mg/g). Barra dan, it-telf ta' piż tal-kampjun (ikkalkulat bħala l-piż tas-sustanza maħlula mnaqqsa mill-piż tal-kampjun inizjali) għandu wkoll jingħata. Id-devjazzjonijiet relattivi standard (RSD) għandhom jiġu kkalkulati. Figuri individwali għandhom jingħataw għas-sustanza totali (polimer + addittivi essenzjali, eċċ.) u għall-polimer biss (jiġifieri wara t-tnaqqis tal-kontribuzzjoni minn dawn l-addittivi).

▼B

2.2. TEST IMWETTAQ B'ŻEWĠ DAQSIJIET DIFFERENTI TAL-KAMPJUN

Il-valuri TOC individwali ta' l-estratt ta' l-ilma taż-żewġ esperimenti ripetuti għal tliet darbiet u l-valur medju għal kull esperiment għandu jingħata espress bħala unità ta' piż għal kull volum ta' soluzzjoni (tipikament mgC/1), kif ukoll f'unità ta' piż għal kull piż tal-kampjun inizjali (tipikament mgC/g).

Jekk m'hemm l-ebda differenza bejn ir-riżultati fil-proporzjonijiet għolja u baxxi tal-kampjun/ilma, dan jista' jindika li l-komponenti li setgħu jiġu estratti kienu fil-fatt estratti kollha. F'dan il-każ, analiżi diretta m'għandhiex normalment tkun meħtieġa.

Il-piżijiet individwali tar-residwi għandhom jingħataw u jiġu espressi f'persentaġġ tal-piżijiet inizjali tal-kampjuni. Il-medji għandhom jiġu kkalkulati għal kull esperiment. Id-differenzi bejn 100 u l-persentaġġi li nstabu jirrappreżentaw il-persentaġġi ta' materjal li jinħall u li jista' jiġi estratt fil-kampjun oriġinali.

3. **RAPPURTAR**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

3.1.1. **Is-sustanza għat-test**

— informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza għat-test (identità, addittivi, impuritajiet, kontenut ta' speċi ta' piż molekulari baxx).

3.1.2. **Kondizzjonijiet esperimentali**

— deskrizzjoni tal-proċeduri użati u kondizzjonijiet esperimentali,

— deskrizzjoni tal-metodi analitiċi u ta' osservazzjoni.

3.1.3. **Riżultati**

— riżultati tal-kapaċità li jinħall/jiġi estratt f'mg/l; valuri medji u individwali għat-testijiet ta' l-estrazzjoni fis-soluzzjonijiet varji, imqassmin f'kontenut polimeru u impuritajiet, addittivi, eċċ.,

— riżultati tal-kapaċità li jinħall/jiġi estratt f'mg/g ta' polimer,

— valuri TOC ta' estratti ta' l-ilma, piż tas-sustanza li tinħall u l-persentaġġi kkalkulati, jekk imkejlin,

— il-pH ta' kull kampjun,

— informazzjoni dwar il-valuri vojta,

— fejn meħtieġ, referenzi għall-instabilità kimika tas-sustanza tat-test, kemm matul il-proċess ta' l-ittestjar kif ukoll il-proċess analitiku,

— l-informazzjoni kollha li hija importanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **PROPRJETAJIET OSSIDIZZANTI (LIKWIDI)**

1. **METODU**

1.1 INTRODUZZJONI

Dan il-metodu tat-test huwa ddisinjat sabiex ikejjel il-potenzjal ta' sustanza likwida li żżid ir-rata tal-ħruq jew l-intensità tal-ħruq ta' sustanza kombustibbli, jew li tifforma taħlita ma' sustanza kombustibbli li tieħu n-nar b'mod spontanju, meta it-tnejn ikunu kompletament imħallta. Dan huwa bbażat fuq it-test tan-NU dwar likwidi ossidizzanti (1) u huwa ekwivalenti għalih. B'danakollu, minħabba li dan il-metodu A.21 huwa primarjament iddisinjat biex jissodisfa l-ħtiġijiet tar-Regolament 1907/2006, huwa meħtieġ il-paragun ma' sustanza ta' referenza waħda. It-testijiet u l-paragun ma' sustanzi addizzjonali ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa meta jkun mistenni li r-riżultati tat-test se jintużaw għal skopijiet oħrajn. ([1])

Dan it-test mhux bil-fors li jitwettaq meta l-eżami tal-formula struttrali jistabbilixxi lil hinn minn kull dubbju raġjonevoli li s-sustanza ma jistax ikollha reazzjoni eżotermika ma' materjal kombustibbli.

Huwa utli li jkun hemm informazzjoni preliminarja dwar il-potenzjal tal-proprjetajiet esploživi tas-sustanza qabel ma jitwettaq it-test.

Dan it-test mhux applikabbli għal solidi, gassijiet, sustanzi li huma ferm fjammabbli jew splussivi, jew perossidi organiċi.

Dan it-test jista' ma jsirx meta r-riżultati tas-sustanza għat-test fit-test tan-NU għal likwidi ossidanti (1) ikunu diġà disponibbli.

1.2 DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Iż-żieda fil-ħin tal-pressjoni medja hija l-medja tal-ħinijiet imkejla għal taħlita li tkun għat-test sabiex tipproduċi żieda fil-pressjoni minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar minn dik atmosferika.

1.3 SUSTANZA TA' REFERENZA

65 % (w/w) aċidu nitriku fl-ilma (grad analitiku) huwa meħtieġ bħala sustanza ta' referenza ([2]).

([1]) Kif, per eżempju, muri fil-kwadru tar-regolamenti ta' trasport tan-NU.

([2]) L-aċidu għandu jiġi ttitrat qabel it-test sabiex tiġi kkonfermata l-konċentrazzjoni tiegħu.

▼B

L-aħjar, jekk l-esperiment jipprevedi li r-riżultati ta' dan it-test jistgħu eventwalment ikunu użati għal skopijiet oħrajn ([1]), l-ittestjar ta' sustanzi ta' referenza addizzjonali jista' jkun xieraq ukoll ([2]).

1.4 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-likwidu għat-test jitħawwad fi proporzjon ta' 1: 1, bil-piż, ma' ċelluloži fibruża u jiġi introdott f'reċipjent ta' pressjoni. Jekk waqt it-taħlit jew waqt il-mili jaqbad b'mod spontanju, l-ebda test ieħor ma jkun meħtieġ.

Jekk ma jaqbadx b'mod spontanju it-test kollu għandu jitwettaq. It-taħlita tisaħħan f'reċipjent ta' pressjoni u l-ħin medju jkun irreġistrat għall-pressjoni li titla' minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar mill-pressjoni atmosferika. Dan jitqabbel maż-żieda fil ħin tal-pressjoni medja għat-taħlita 1: 1 tas-sustanza(i) ta' referenza u ċ-ċelluloži.

1.5 KRITERJA TA' KWALITÁ

F'serje ta' ħames provi fuq sustanza waħda l-ebda riżultat m'għandu jiddiferixxi b'aktar minn 30 % mill-medja aritmetika. Ir-riżultati li jiddiferixxu b'aktar minn 30 % minn dik il-medja għandhom jitwarrbu, il-proċedura tat-taħlit jew tal-mili tittejjeb u t-test jiġi ripetut.

1.6 DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1 **Preparazzjoni**

1.6.1.1 *Sustanza kombustibbli*

Sustanza xotta, fibruża, biċ-ċelluloži b'fibra b'tul ta' bejn 50 u 250 μm u dijametru medju ta' 25 μm, ([3]) tintuża bħala l-materjal kombustibbli. Din titnixxef għal piż kostanti f'saff ta' mhux aktar minn 25 mm ħxuna f'105 °C għal 4 sigħat u tinżamm f'dessikatur, bid-dessikant, sakemm tibred u tkun meħtieġa għall-użu. Il-kontenut ta' l-ilma taċ-ċelluloži xotta għandu jkun anqas minn 0,5 % f'piż xott ([4]). Jekk meħtieġ, il-ħin tat-tnixxif għandu jittawwal sabiex jintlaħaq dan il-livell ([5]). L-istess lott ta' ċelluloži għandu jintuża matul it-test kollu.

([1]) Kif, per eżempju, muri fil-kwadru tar-regolamenti ta' trasport tan-NU.
([2]) Eż.: 50 % (w/w) aċidu perkloriku u 40 % (w/w) klorat tas-sodju jintużaw f'referenza 1.
([3]) eż. Trab taċ-Ċelluloża għal — Kolonni tal-Kromatografija Whatman CF11, nru tal-katalgu 4021050.
([4]) Konfermat minn (eż.) titrazzjoni Karl-Fisher.
([5]) Alternattivament, dan il-kontenut ta' ilma jista' jintlaħaq (eż.) b'tisħin f'105 °C taħt vakwu għal 24 h.

▼B

1.6.1.2 *Apparat*

1.6.1.2.1 Reċipjent ta' pressjoni

Reċipjent ta‘ pressjoni huwa meħtieġ. Ir-reċipjent jikkonsisti minn reċipjent ċilindriku ta' pressjoni ta' l-azzar 89 mm tul u 60 mm dijametru estern (ara l-figura 1). Żewġ pjanċi huma msawwra b'magna fuq in-naħat opposti (il-*cross section* tar-reċipjent b'hekk tonqos għal 50 mm) sabiex ikun iffaċilitat it-twaħħil tal-plagg li jqabbad u tat-tapp tal-vent. Ir-reċipjent, b'ċirkonfernza interna ta' 20 mm u ribattut f'kull tarf għall-fond ta' 19 mm u b'kamin li jaċċetta 1” *British Standard Pipe* (BSP) jew l-ekwivalenti metriku. It-*take-off* tal-pressjoni, fl-għamla ta' driegħ laterali, tiġi invitata fuq il-wiċċ tal-kurva tar-reċipjent ta' pressjoni, 35 mm minn tarf wieħed u 90º mill-pjanċi msawwra b'magna. Il-plagg għal dan jitħaffer għal fond ta' 12 mm u jingħata l-kamin sabiex jaċċetta 1/2” BSP (jew metriku ekwivalenti) fit-tarf l-ieħor tad-driegħ. Jekk meħtieġ, siġill inert jitwaħħal sabiex jassigura siġill li ma jgħaddix gass minnu. Id-driegħ tal-ġenb jestendi għall-55 mm lil hinn mil-qafas tar-reċipjent ta' pressjoni u jkollu ħofra interna ta' 6 mm. It-tarf tad-driegħ tal-ġenb ikun ribattut u jkollu kamin sabiex jaċċetta *transducer* tal-pressjoni tat-tip bid-dijaframma. Kwalunkwe apparat li jkejjel il-pressjoni jista' jintuża basta dan ma jkunx effettwat minn gassijiet sħan jew minn dikompożizzjoni ta' prodotti u jkun kapaċi jirrispondi għal rati ta' żieda fil-pressjoni ta' 690-2 070 kPa f'mhux aktar minn 5ms.

It-tarf l-aktar 'il bogħod mid-driegħ tal-ġenb tar-reċipjent ta‘ pressjoni jingħalaq bi plagg li jqabbad u li jkun mgħammar b'żewg elettrodi, waħda insulata minn ġewwa, u l-oħra mwaħħla ma' l-*earth*, mal-plagg taċ-ċilindru. It-tarf l-ieħor tar-reċipjent ta‘ pressjoni jingħaluq b'disk li tinfaqa' (pressjoni tat-tifqigħ ta' madwar 2 200 kPa) miżmuma fil-post b'plagg li jżomm li jkollu ħofra ta' 20 mm. Jekk meħtieġ, siġill inert jintuża mal-plagg li jqabbad sabiex jiżgura rabta tajba li ma jgħaddix gass minnha. Stend ta' frid (il-figura 2) iservi sabiex iżomm l-immuntar fil-pożizzjoni t-tajba matul l-użu. Dan normalment ikun jinkludi pjanċa ta' l-azzar artab b'kejl ta' 235 mm × 184 mm × 6 mm u 185 mm tul b'sezzjoni kwadra mħaffra (S.H.S.) 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Sezzjoni tkun maqtugħa minn kull wieħed mill-ġnub opposti fit-tarf ta' l-S.H.S. hekk li tirriżulta struttura b'żewġ saqajn bil-ġenb ċatt li fuqha tistrieħ *box section* intatta b'tul ta' 86 mm. It-truf ta' dawn il-ġnub ċatti huma maqtugħa għal angolu ta' 60º mal-lat orizzontali u iwweldjati mal-pjanċa tal-qiegħ. Qasma bil-kejl ta' 22 mm wisa' x 46 mm fond tinqata’ b'mod mekkaniku fuq naħa waħda fit-tarf ta' fuq tas-sezzjoni tal-qiegħ hekk li l-immuntar tar-reċipjent ta' pressjoni jitniżżel, it-tarf tal-plagg li jqabbad jiddaħħal l-ewwel, fil-*box section* ta' l-irfid tas-sezzjoni, bid-driegħ tal-ġenb akkomodat f'dik il-qasma. Biċċa azzar 30 mm wisa' u 6 mm ħxuna tkun iwweldjata mal-wiċċ intern l-aktar baxx tas-sezzjoni tal-*box section* sabiex taġixxa bħala *spacer*. Żewġ skorfini *butterfly,* bil-kamin fuq il-wiċċ oppost, iservu sabiex iżommu r-reċipjent ta' pressjoni f'pożizzjoni soda. Żewġ strippi 12 mm wiesa' magħmulin minn azzar ta' 6 mm ħxuna, iwweldjati mal-biċċiet tal-ġenb li joħorġu mill-bażi tal-*box section*, jirfdu r-reċipjent tal-pressjoni minn taħt.

▼B

1.6.1.2.2 Sistema li tagħti n-nar

Is-sistema li tagħti n-nar tikkonsisti minn wajer ta' Ni/Cr twil 25 cm b'dijametru ta' 0,6 mm u b'reżistenza ta' 3,85 ohm/m. Il-wajer jinbaram, bl-użu ta' virga b'dijametru ta' 5 mm, f'għamla ta' romblu u jintrabat ma' l-elettrodi tal-plagg li jqabbad. Ir-romblu għandu jkollu waħda mill-konfigurazzjonijiet murija fil-figura 3. Id-distanza bejn il-qiegħ tar-reċipjent u l-parti t'isfel tar-romblu li jqabbad għandha tkun 20 mm. Jekk l-elettrodi ma jkunux aġġustabbli, it-trufijiet tal-wajer li jqabbad bejn ir-romblu u l-qiegħ tar-reċipjent għandhom ikunu insulati b'kisja taċ-ċeramika. Il-fil jissaħħan b'kurrent kostanti ta' l-elettriku li jista' jforni mill-anqas 10 A.

1.6.2 **It-twettiq tat-test** ([1])

L-apparat, immuntat kollu kemm hu bit-*transducer* tal-pressjoni u s-sistema tas-sħana imma mingħajr il-plattina li tinfaqa', huwa mirfud bit-tarf tal-plagg li jqabbad fin-naħa t'isfel. 2,5 g mill-likwidu tat-test jitħallat ma' 2,5 g taċ-ċelluloża mnixxfa f'*beaker* tal-ħġieġ bl-użu ta' virga tal-ħġieġ għat-tħawwid ([2]). Bħala prekawzjoni kontra l-periklu, it-tħawwid għandu jitwettaq wara tarka tas-sikurezza bejn l-operatur u t-taħlita. Jekk it-taħlita taqbad matul it-tħawwid jew waqt il-mili, il-kumplament tat-test mhux meħtieġ. It-taħlita tiżdied, fi porzjonijiet żgħar u bit-taptip, fir-reċipjent tal-pressjoni waqt li jkun żgurat li t-taħlita tkun ippakkjata madwar il-bobina li tqabbad u li tkun f'kuntatt tajjeb magħha. Huwa importanti li l-bobina ma titgħaffiġx waqt il-proċess ta' l-ippakkjar minħabba li dan jista' jwassal għal riżultati ħżiena ([3]). Il-plattina ti tinfaqa' titqiegħed f'postha u l-plagg li jżomm jiġi invitat sewwa. Ir-reċipjent kif hekk imħejji jkun trasferit għal fuq l-istand ta' rfid ta' tqabbid, bil-plattina li tinfaqa' fuq in-naħa ta' fuq, u r-reċipjent għandu jkun lokalizzat f'armarju ventilat xieraq jew inkella f'ċellula li tqabbad. L-għejun ta' l-elettriku jintrabat mat-trufijiet esterni tal-plagg li jqabbad u jiġu applikati 10 A. Il-ħin minn meta jibda t-taħlit u jinxtegħel l-elettriku m'għandux jeċċedi l-10 minuti.

Is-sinjal prodott mit-*transducer* tal-pressjoni jkun irreġistrat fuq sistema xierqa li tippermetti kemm il-valutazzjoni u kif ukoll il-ġenerazzjoni ta' reġistrazzjoni permanenti tal-profil tal-ħin mal-pressjoni (eż. reġistratur b'kurrent qasir ma' reġistratur *chart*). It-taħlita tissaħħan sakem il-plattina li tinfaqa' tinkiser jew sakemm mill-anqas ikunu għaddew 60 s. Jekk il-plattina li tinfaqa' ma tinkisirx, it-taħlita għandha titħalla tibdred qabel ma, b'galbu kbir, l-apparat jiżżarma, billi jittieħdu l-prekawzjonijiet għal xi forza ta' pressjoni li jista jkun hemm. Għandhom jitwettqu ħames provi bis-sustanza tat-test u bis-sustanza(i) tar-referenza. Il-ħin meħtieġ sabiex il-pressjoni titla' minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar mill-pressjoni atmosferika għandu jkun innotat. Il-ħin taż-żieda medja fil-pressjoni tkun ikkalkulata.

F'ċerti każijiet, is-sustanzi jistgħu jiġġeneraw żieda fil-pressjoni (għolja wisq jew baxxa wisq), minħabba r-reazzjonijiet kimiċi li ma jkunux jikkaratterizzaw il-proprjetajiet ossidanti tas-sustanza. F'dawn il-każijiet, jista' jkun hemm il-ħtieġa li jkun ripetut it-test b'sustanza inerta, eż. diatomit (*kieselguhr*), minflok iċ-ċelluloża, sabiex tkun iċċarata n-natura tar-reazzjoni.

([1]) Taħlitiet ta' ossidanti maċ-ċelluloża għandhom jitqiesu bħala potenzjalment esplożiv u għandhom jintużaw bil-galbu xieraq.

([2]) Fil-prattika dan jista' jsir bil-preparament ta' taħlita ta' 1:1 ta' likwidu għat-test u ċelluloża f'ammont akbar milli meħtieġ għat-test u bit-trasferiment ta' 5 ± 0,1 g fir-reċipjent tal-pressjoni. It-taħlita għandha tiġi ppreparata friska għal kull esperiment.

([3]) B'mod partikolari, il-kuntatt bejn it-tidwiriet ta' ħdejn xulxin tal-bobina għandu jiġi evitat.

▼B

2. **DATA**

Il-ħinijiet taż-żieda fil-pressjoni kemm għas-sustanza tat-test u wkoll għas-sustanza(i) ta' referenza. Il-ħinijiet taż-żieda fil-pressjoni għat-testijiet b'sustanza inerta, jekk imwettqa.

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Il-ħinijiet taż-żieda fil-pressjoni kemm għas-sustanza tat-test u wkoll għas-sustanza(i) ta' referenza jkunu ikkalkulati.

Il-ħinijiet taż-żieda fil-pressjoni għat-testijiet b'sustanza inerta, (jekk imwettqa) jkunu ikkalkulati.

Uħud mill-eżempji tar-riżultati huma murija fit-Tabella 1

Tabella 1

Eżempji tar-riżultati [a]

Sustanza [b]	Il-ħin taż-żieda medja fil-pressjoni ta' taħlita ta' 1:1 maċ-ċelluloża (ms)
Dikromat ta' l-ammonju, taħlita saturata fl-ilma	20 800
Nitrat tal-kalċju, taħlita saturata fl-ilma	6 700
Nitrat ferriku, taħlita saturata fl-ilma	4 133
Perklorat tal-litjum, taħlita saturata fl-ilma	1 686
Perklorat tal-magnežju, taħlita saturata fl-ilma	777
Nitrat tan-nikil, taħlita saturata fl-ilma	6 250
Aċidu nitriku, 65 %	4 767 [c]
Aċidu perkoriku, 50 %	121 [c]
Aċidu perkoriku, 55 %	59
Nitrat tal-potassju, 30 % taħlita fl-ilma	26 690
Nitrat tal-fidda, taħlita saturata fl-ilma	— [d]
Klorat tas-sodju, 40 % taħlita fl-ilma	2 555 [c]
Nitrat tas-sodju, 45 % taħlita fl-ilma	4 133
Sustanza inerta	
Ilma:Ċelluloża	— [d]

[a] ara r-referenza (1) għall-klassifika skond l-iskema tat-trasport tan-NU.
[b] Is-soluzzjonijiet saturati għandhom jitħejjew f'20 °C.
[c] Valur medju minn esperimenti komparattivi minn laboratorji differenti.
[d] Il-pressjoni massima ta' 2 070 kPA ma ntlaħqitx.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1 RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— l-identità, il-kompożizzjoni, il-purità, eċċ. tas-sustanza għat-test;

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— il-proċedura użata għat-tnixxif taċ-ċelluloża;

— il-kontenut ta' l-ilma użat fiċ-ċelluloża;

— ir-riżultati tal-kejl;

— ir-riżultati mit-testijiet b'sustanza inerta, jekk ikun hemm;

— il-ħinijiet medji taż-żieda fil-pressjoni kkalkulati;

— xi devjazzjonijiet minn dan il-metodu u r-raġunijiet ta' dawn;

— l-informazzjoni addizzjonali kollha, jew ir-rimarki, dwar l-interpretazzjoni tar-riżultati;

3.2 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI ([1])

Ir-riżultati tat-test huma vvalutati fuq il-bażi ta':

a) jekk it-taħlita tas-sustanza għat-test u ċ-ċelluloża jaqbdux b'mod spontanju; u

b) il-paragun fil-ħin medju meħtieġ sabiex il-pressjoni titla' minn 690 kPa għal 2 070 kPa, mas-sustanza(i) ta' referenza.

Sustanza likwida għandha titqies ossidanti, meta:

a) taħlita 1:1, fil-piż, tas-sustanza u ċ-ċelluloża taqbad b'mod spontanju; jew

b) taħlita 1:1, fil-piż, tas-sustanza u ċ-ċelluloża turi żieda fil-ħin tal-medja tal-pressjoni li tkun anqas minn jew ugwali għal, żieda fil-ħin għal taħlita 1:1 fil-piż, ta' 65 % (w/w) aċidu nitriku fl-ilma u ċelluloża.

Sabiex ikunu evitati riżultati pożittivi foloz, ir-riżultati mogħtija meta tiġi ttestjata s-sustanza għat-test ma' materjal inert, għandhom jitqiesu wkoll fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

([1]) Ara r-referenza 1 għall-interpretazzjoni tar-riżultati skond ir-regolamenti għat-trasport tan-NU bl-użu ta' bosta sustanzi ta' referenza.

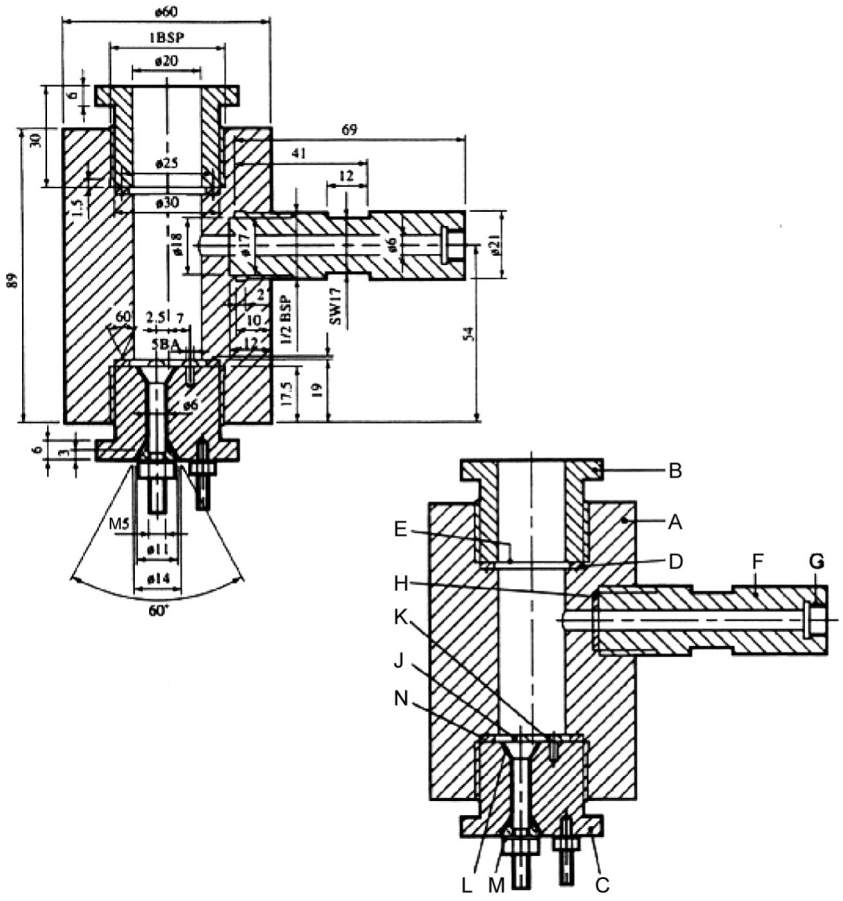
▼B

4. **REFERENZI**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. It-tielet edizjoni riveduta. Pubblikazzjoni tal-NU, Nru.: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, paġna 342. Test O.2: Test għall-likwidu ossidanti

Figura 1

Reċipjent tal-Pressjoni



(A) Il-qafas tar-reċipjent tal-pressjoni

(B) Il-plagg li jżomm id-disk li jinfaqa'

(C) Il-plagg li jqabbad

(D) Washer minn ċomb artab

(E) Id-disk li jinfaqa'

(F) Id-driegħ tal-ġenb

(G) Ir-ras tat-transducer tal-pressjoni

(H) Il-washer

(J) L-elettrodu bl-in-sulazzjoni

(K) L-elettrodu ma' l-earth

(L) L-insulazzjoni

(M) Il-kona ta' l-azzar

(N) Il-kanal li jobronn il-washer

▼B

Figura 2

Stend għall-irfid

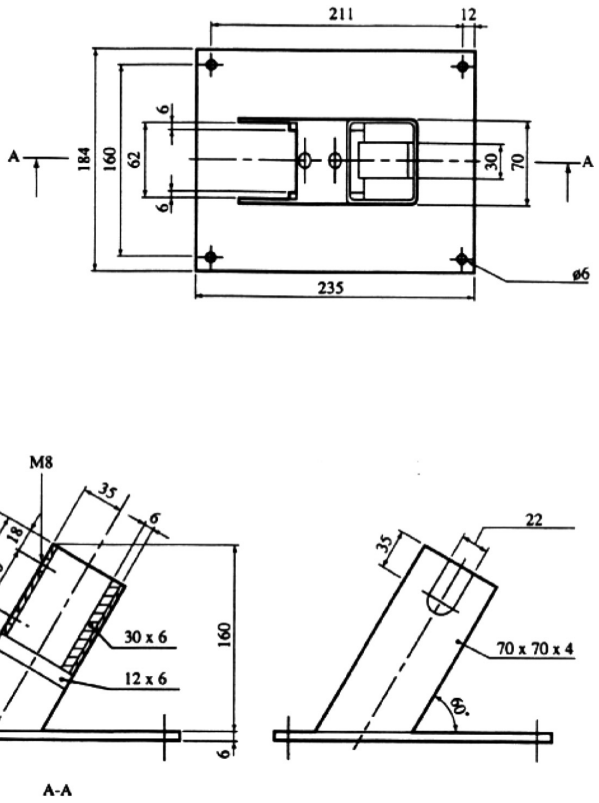
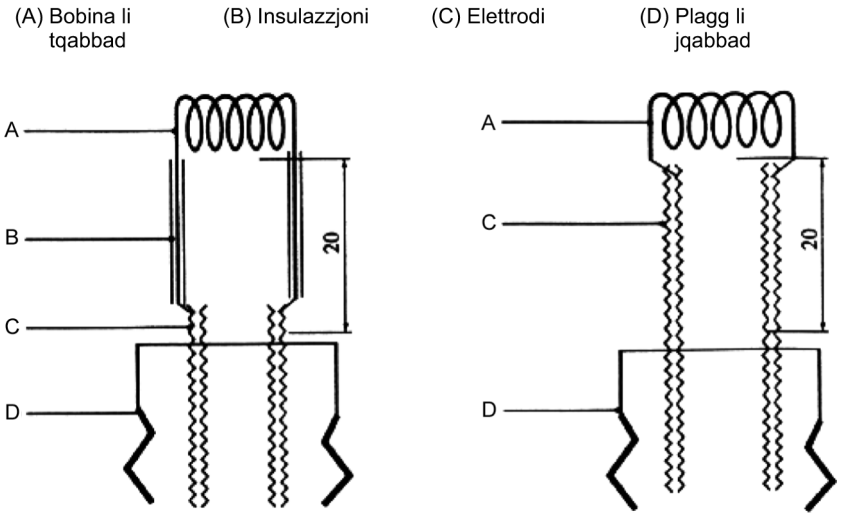


Figura 3

Sistema li tqabbad



Nota: tista' tintuża kwalunkwe konfigurazzjoni minn dawn.

▼M1

A.22. **ID-DIJAMETRU MEDJU ĠEOMETRIKU TAL-FIBRI PEŻAT SKONT IT-TUL TAGĦHOM**

1. **IL-METODU**

1.1. DAĦLA

Dan il-metodu jiddeskrivi proċedura li tkejjel id-Dijametru Medju Ġeometriku Peżat Skont it-Tul [Length Weighted Geometric Mean Diameter] (LWGMD) ta' massa ta' Fibri Minerali Magħmula mill-Bniedem [Man Made Minerla Fibres] (MMMF). Minħabba li l-LWGMD tal-popolazzjoni se jkollha probabbiltà ta' 95 % li tkun bejn il-livelli ta' kunfidenza ta' 95 % (LWGMD ± żewġ devjazzjonijiet standard) tal-kampjun, il-valur irrapportat (il-valur tat-test) se jkun l-inqas limitu ta' kunfidenza ta' 95 % tal-kampjun (iġifieri LWGMD — 2 devjazzjonijiet standard). Il-metodu huwa bbażat fuq aġġornament (Ġunju 1994) ta' abbozz ta' proċedura industrijali HSE maqbula fil-laqgħa bejn l-ECFIA u l-HSE f'Chester fis-26/9/93 u żviluppat għal u permezz ta' tieni prova interlaboratorja (1, 2). Dan il-metodu ta' kejl jista' jintuża sabiex jikkaratterizza d-dijametru tal-fibra ta' sustanzi tal-massa jew prodotti li fihom l-MMMFs u jinkludu fibri ta' ċeramika refrattarja (RCF), fibri tal-ħġieġ magħmula mill-bniedem (MMVF), u fibri tal-kristallina u l-polikristallina.

L-ippeżar tat-tul huwa mod ta' kumpens għall-effett fuq id-distribuzzjoni tad-dijametru kkawżata bit-tkissir ta' fibri twal meta jkunu qed isiru l-kampjuni jew jitmiss il-materjal. Tintuża statistika ġeometrika (medja ġeometrika) sabiex tkejjel id-distribuzzjoni tad-daqs tad-dijametri tal-MMMF għaliex ġeneralment dawn id-dijametri jkollhom distribuzzjonijiet tad-daqs li jqarbu n-norma logaritmika.

Il-kejl tat-tul kif ukoll tad-dijametru huwa tedjanti u jieħu ħafna ħin imma, jekk jitkejlu biss dawk il-fibri li jmissu linja infinitament irqieqa fuq il-firxa viżiva ta' SEM, imbagħad il-probabbiltà li tingħażel waħda mill-fibri tkun proporzjonali għat-tul tagħha. Minħabba li b'hekk jitqies it-tul fil-kalkoli tal-ippeżar tat-tul, l-uniku kejl meħtieġ huwa d-dijametru u l-LWGMD-2SE jista' jkun ikkalkulat kif deskritt.

1.2. TIFSIRIET

Il-partikula: Oġġett li għandu proporzjon bejn it-tul u l-wisa' ta' inqas minn 3:1.

Il-fibra: Oġġett li għandu proporzjon bejn it-tul u l-wisa' (aspect ratio) mill-inqas 3:1.

1.3. AMBITU U LIMITAZZJONIJIET

Il-metodu huwa ddisinjat sabiex janalizza d-distribuzzjoni ta' dijametri li jkollhom valur medja bejn 0,5 μm u 6 μm. Dijametri ikbar jistgħu jitkejlu bl-użu ta' ingrandimenti minn SEM iktar baxxi iżda l-metodu se jkun dejjem iktar limitat fid-distribuzzjonijiet tal-fibra iktar fini u jekk id-dijametru medjan ikun inqas minn 0,5 μm, huwa rrakkomandat kejl permezz ta' TEM (transmission electron microscope).

▼M1

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-ITTESTJAR

Numru ta' kampjuni rappreżentattivi tal-qalba jittieħdu mill-kutra tal-fibra jew jiġu mislutin mill-massa tal-fibra. Il-fibri tal-massa jitqassru bl-użu ta' proċedura tat-tifrik u sottokampjun rappreżentattiv mxerred fl-ilma. Il-biċċiet jiġu estratti u ffiltrati minn filtru tal-polikarbonat b'pori tad-daqs 0,2 μm u jiġu ppreparati għal analiżi bl-użu ta' tekniki tal-iscanning electron microscope (SEM). Id-dijametri tal-fibri jitkejlu taħt ingrandiment tal-iskrin ta' × 10 000 jew ikbar ([1]) bl-użu ta' metodu ta' interċetazzjoni tal-linja sabiex tittieħed stima imparzjali tad-dijametru medjan. L-inqas intervall tal-kunfidenza ta' 95 % (ibbażat fuq test unilaterali) jiġi kkalkulat sabiex issir stima tal-iżjed valur baxx tal-medju ġeometriku tad-dijametru tal-fibra tal-materjal.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-ITTESTJAR

1.5.1. **Il-prekawzjonijiet / is-sikurezza**

L-espożizzjoni tal-persuni għall-fibri fl-arja għandha tkun imminimizzata u għandha tintuża vetrina li tkun mgħammra b'ventilatur għall-estrazzjoni jew kaxxa mgħammra bl-ingwanti sabiex isir kuntatt mal-fibri niexfa. Għandu jitwettaq monitoraġġ prejodiku tal-espożizzjoni tal-persuna sabiex tiġi determinata l-effikaċja tal-metodi ta' kontroll. Meta jisir kuntatt mal-MMMFs għandhom jintlibsu l-ingwanti li jintremew sabiex tonqos l-irritazzjoni tal-ġilda u tkun evitata l-kontaminazzjoni min-naħa għall-oħra.

1.5.2. **L-apparat / it-tagħmir**

— Pressa u dadi tal-mastri (b'kapaċità li jipproduċu 10 MPa).

— filtri kapillari tal-polikarbonat bid-daqs tal-pori ta' 0,2 μm (dijametru ta' 25 mm).

— filtru ta' membrana tal-ester taċ-ċelluloża bid-daqs tal-pori ta' 5 μm sabiex jintuża bħala filtru tal-appoġġ.

— Apparat tal-ħġieġ għall-filtrazzjoni (jew sistemi tal-filtrazzjoni li jintremew) li jieħu filtri li għandhom dijametru ta' 25 mm (eż. Millipore glass microanalysis kit, tat-tip nru XX10 025 00).

— Ilma li jkun għadu kemm ġie ddistallat, iffiltrat minn filtru bid-daqs tal-pori ta' 0,2 μm sabiex jitneħħew il-mikro-organiżmi.

— Pulverizzatur li jkopri d-deheb jew deheb u palladju.

— Scanning electron microscope li kapaċi jirrisolvi sa' 10 nm u jkabbar b'10 000.

— Mixxellanji: spatuli, xafra tal-iskarpell tat-tip 24, pinzetta, tubi tas-SEM, kolla tal-karbonju jew tejp adeżiv tal-karbonju, irbaba tal-fidda.

— Sonda ultrasonika jew banju ultrasoniku li joqgħod fuq bank

— Core sampler jew cork borer, sabiex jieħu l-kampjuni tal-qalba mill-kutra tal-MMMF

([1]) Dan il-valur ta' ingrandiment huwa indikat għall-fibri tad-daqs 3 μm, għall-fibri tad-daqs 6 μm ingrandiment ta' × 5 000 jaf ikun aħjar.

▼**M1**

1.5.3. **Il-Proċedura tat-test**

1.5.3.1. *It-teħid tal-kampjuni*

Jintuża core sampler ta' 25 mm jew cork borer sabiex jittieħdu kampjuni tal-profil trasversali. Dawn għandhom ikunu spazjati b'mod ekwu matul il-wisa' ta' tul qasir tal-kutra jew meħuda minn partijiet sporadiċi jekk ikun hemm biċċiet twal tal-kutra disponibbli. L-istess tagħmir jista' jintuża sabiex jiġu estratti kampjuni sporadiċi minn fibri maħlula. Meta huwa possibli għandhom jittieħdu sitt kampjuni, sabiex jirriflettu l-varjazzjonijiet tal-ispazju fil-materjal tal-massa.

Is-sitt kampjuni tal-qalba għandhom jitfarku b'dada li jkollha dijametru ta' 50 mm b'10 Mpa. Il-materjal jitħallat bi spatula u jerġa jiġi ppressat b'10 Mpa. Il-materjal imbagħad jitneħħa mid-dada u jinħażen fi flixkun tal-ħġieġ issiġillat.

1.5.3.2. *Il-Preparazzjoni tal-Kampjun*

Fejn jeħtieġ, tista' titneħħa il-kopertura organika li taqqad billi l-fibra titqiegħed ġo forn b'temperatura ta' 450 grad C għal madwar siegħa.

Sabiex ikun sottodiviż il-kampjun għandu jinqasam f'kon u fi kwarti (dan għandu jsir ġewwa vetrina tat-trab).

Bl-użu ta' spatula, żid ammont żgħir (< 0,5 g) tal-kampjun ma' 100 ml ilma li jkun għadu kemm ġie ddistillat u ffiltrat minn ġo filtru b'membrana ta' 0,2 μm (sorsi alternattivi ta' ilma purissimu jistgħu jintużaw, jekk jirriżulta li huma xierqa). Ħallat sew bl-użu ta' sonda ultrasonika li topera b'saħħa ta' 100 W u intunata sabiex tifforma ħofra fl-istruttura. (Jekk ma tkunx disponibbli sonda uża l-metodu li ġej: ċaqlaq l'hemm u l'hawn u dawwar repetittivament għal madwar 30 sekonda; qiegħdu f'banju ultrasoniku li joqgħod fuq bank għal madwar ħames minuti; imbagħad ċaqalqu l'hemm u l'hawn u dawwru repetittivament għal madwar 30 sekonda oħra).

Eżatt wara t-tixrid tal-fibra, neħħi numru ta' alikwoto (eż. tliet alikwoti ta' 3, 6 u 10 ml) bl-użu ta' pipetta bl-għonq wiesa (li tesa' 2-5 ml).

Iffiltra f'vakum kull alikwota b'filtru tal-polikarbonat ta' 0,2 μm appoġġjat b'filtru tal-appoġġ li għandu pora MEC ta' 5 μm, bl-użu ta' lenbut tal-filtrazzjoni tal-ħġieġ ta' 25 mm li jkollu depożitu tal-likwidu ċilindriku. Fil-lenbut għandhom jitqegħdu madwar 5 ml ta' ilma distillat iffiltrat u l-alikwot titqiegħed bil-mod fl-ilma bl-użu tal-pipetta fejn il-ponta tagħha tinżamm taħt il-menisku. Il-pipetta u d-depożitu tal-likwidu iridu jiġu mlaħalħa sew wara dan il-proċess bil-pipetta, għaliex il-fibri irqaq għandhom tendenza li jkunu iżjed fil-wiċċ.

B'attenzjoni neħħi l-filtru u sseparah mill-filtru tal-appoġġ qabel ma' tqiegħdu f'kontenitur biex jinxef.

▼M1

Aqta sezzjoni daqs ta' kwart jew nofs tad-depożitu ffiltrat b'xafra tal-iskarpell tat-tip 24 b'moviment 'l hinn u 'l hawn tal-id. B'attenzjoni waħħal is-sezzjoni maqtuha ma' trej tas-SEM permezz ta' tejp tal-karbonju jew kolla tal-karbonju. Għandhom jiġu applikati l-irbaba tal-fidda f'tal-inqas tliet pożizzjonijiet sabiex jittejjeb il-kuntatt eletriku fit-truf tal-filtru u tat-trej. Meta l-kolla / l-irbaba tal-fidda tinxef/jinxfu, bil-pulverizzatur agħmel kopertura ta' madwar 50 nm ta' deheb jew deheb u palladju fuq il-wiċċ tad-depożitu.

1.5.3.3. *Il-kalibrar tas-SEM u l-operat*

1.5.3.3.1. Il-kalibrar

Il-kalibrar tas-SEM għandu jkun ikkontrollat tal-inqas darba fil-ġimgħa (idealment darba kuljum) bl-użu ta' xibka tal-kalibrazzjoni ċċertifikata. Il-kalibrar għandu jkun ikkontrollat skont standard iċċertifikat u jekk il-valur mkejjel (SEM) ma jkunx f'medda ta' ± 2 % tal-valur iċċertifikat, il-kalibrar tas-SEM irid ikun aġġustat u jerġa jkun ikkontrollat.

Is-SEM irid ikun kapaċi jirrisolvi tal-inqas dijametru b'viżibbiltà minima ta' 0,2 μm, bl-użu ta' matriċi ta' kampjun reali, b'ingrandiment ta' x 2 000.

1.5.3.3.2. L-operat

Is-SEM għandu jkun operat fuq ingrandiment ta' 10 000 ([1]) bl-użu ta' kundizzjonijiet li jagħtu reżoluzzjoni tajba b'immaġini aċċetabbli b'rati baxxi ta' skan bħal, per eżempju, 5 sekondi għal kull ritratt. Għalkemm il-ħtiġijiet tal-operat ta' SEMs differenti jistgħu ivarjaw, ġeneralment sabiex tinkiseb l-aħjar viżibbiltà u reżoluzzjoni, b'materjali li relattivament għandhom daqs atomiku żgħir, għandhom jintużaw vultaġġi t'aċċelerazzjoni ta' bejn 5-10 keV issetjati fuq tikka ta' daqs żgħir u distanza tax-xogħol qasira. Meta jkun qiegħed isir it-travers lineari, għandha tintuża inklinazzjoni ta' 0º sabiex ikun minimizzat il-bżonn li terġa tiffoka jew, jekk is-SEM għandu stage ewċentrika, għandha tintuża l-istage ewċentrika Jista' jintuża ingrandiment iktar baxx jekk il-materjal m'għandux fibri (b'dijametru) żgħar u d-dijametri tal-fibri huma kbar (> 5 μm)

1.5.3.4. *Il-kejl tad-daqs*

1.5.3.4.1. Eżami taħt ingrandiment baxx sabiex ikun ivvalutat l-kampjun

Fil-bidu l-kampjun għandu jiġi eżaminat taħt ingrandiment baxx sabiex isir tfittix għal evidenza ta' tagħqid ta' fibri kbar u sabiex issir valutazzjoni tad-densità tal-fibri. Fil-każ ta' wisq għoqod huwa rrakomandat li jiġi ppreparat kampjun ġdid.

Huwa meħtieġ li jitkejjel numru minimu ta' fibri għall-korettezza fl-istatistika u d-densità għolja tal-fibri taf tkun mixtieqa għaliex l-eżaminazzjoni tal-partijiet vojta tieħu ħafna ħin u ma tagħtix kontribut għall-analiżi. Madankollu, jekk il-filtru ikun mimli wisq, isir diffiċli biex jitkejlu l-fibri kollha li jistgħu jiġu mkejla u, peress li li l-fibri ż-żgħar jistgħu jinħbew wara oħrajn li huma ikbar, tista' ma tindunax bihom.

([1]) Għall-fibri tad-daqs 3 μm, ara n-nota ta' qabel.

▼**M1**

Il-parzjalità lejn stima eċessiva tal-LWGMD tista' tirriżulta minn fibri li għandhom densità ta' iktar minn 150 fibra f'kull millimetru tal-linja traversa. Minn naħa l-oħra, il-konċentrazzjonijiet tal-fibra baxxi jżidu l-ħin tal-analiżi u, spiss, finanzjarjament ikun jaqbel li jiġi ppreparat kampjun b'densita tal-fibra iżjed viċin l-ottimu milli tkompli bl-għadd ta' filtri li għandhom konċentrazzjoni baxxa. L-aħjar densità tal-fibra għandha tagħti medju ta' madwar fibra waħda jew tnejn f'kull firxa viżiva taħt ingrandiment ta' x 5 000. Minkejja dan, l-aħjar densità tiddependi fuq id-daqs (dijametru) tal-fibri, għalhekk jeħtieġ li l-operatur juża xi ġudizzju espert sabiex jiddeċidi jekk id-densità tal-fibra hijiex ottima jew le.

1.5.3.4.2. L-ippeżar skont it-tul tad-dijametri tal-fibri

Jingħaddu biss dawk il-fibri li jmissu (jew jaqsmu) linja (infinitament) rqiqa mpinġija fuq l-iskrin tas-SEM. Għal din ir-raġuni titpinġa linja orizzontali (jew vertikali) fiċ-ċentru tal-iskrin.

Alternattivament jitqiegħed punt uniku fiċ-ċentru tal-iskrin u jiġi inizjat skan kontinwu f'direzzjoni waħda matul il-filtru. Kull fibra li għandha aspect ratio ikbar minn 3:1 li tmiss jew taqsam dan il-punt ikollha d-dijametru mkejjel u rreġistrat.

1.5.3.4.3. Il-kejl tad-daqs tal-fibra

Huwa rrakkomandat li jiġu mkejla minimu ta' 300 fibra. Kull fibra tiġi mkejla darba biss fil-punt tal-intersezzjoni mal-linja jew il-punt impinġi fuq l-immaġini (jew viċin tal-punt tal-intersezzjoni jekk it-truf tal-fibri huma moħbija). Jekk tiltaqa' ma' fibri li għandhom profil sezzjonali mhux uniformi, għandu jintuża kejl li jirrapreżenta l-medju tad-dijametru tal-fibra. Għandha tingħata attenzjoni għal kif jiġi definit it-tarf u kif tiġi mkejla l-iqsar distanza bejn it-truf tal-fibra. Il-kejl tad-daqs jista' jsir on-line, jew off-line fuq immaġini jew ritratti maħżuna. Huma rrakkomandati sistemi semi awtomatiċi li jkejlu l-immaġini li jniżżlu d-dejta direttament fuq spreadsheet, għaliex inaqqsu t-telf ta' ħin, jeliminaw l-iżbalji tat-traskrizzjoni u l-kalkoli jistgħu jiġu awtomatizzati.

It-truf tal-fibri twal għadhom ikunu kkontrollati taħt ingrandiment baxx sabiex tiżgura li mhux qed jinbarmu lura ġol-firxa viżiva u qed jiġu mkejla darba biss.

2. **ID-DEJTA**

2.1. IT-TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Normalment, iddijametri tal-fibri ma jkollhomx distribuzzjoni normali. Madankollu, permezz ta’ trasformazzjoni logaritmika jkun possibbli li tikseb distribuzzjoni li toqrob aktarlejn in-normal.

Ikkalkula l-medju aritmetiku (medju lnD) u d-devjazzjoni standard (SD_{lnD}) tal-logaritmu ta' valuri tal-bażi e (lnD) tad-dijameteri (D) ta’ n fibri..

$$\text{mean } lnD = \frac{\Sigma lnD}{n} \quad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma (\ln D - \text{mean } \ln D)^2}{n-1}} \quad (2)$$

Iddividi d-devjazzjoni standard bir-radiċi kwadrata tan-numru (n) ta' kejl differenti sabiex tikseb id-devjazzjoni standard (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Naqqas għal darbtejn il-valur tad-devjazzjoni standard mill-medju u kkalkula l-esponenzjali ta' dan il-valur (il-medju bit-tnaqqis ta' żewġ devjazzjonijiet standard) sabiex toħroġ il-medju ġeometriku bit-tnaqqis ta' żewġ devjazzjonijiet standard ġeometriċi.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } \ln D - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas it-tagħrif li ġej:

— Il-valur tal-LWGMD-2SE.

— Kwalunkwe devjazzjoni u b'mod partikolari dawk li jista' jkollhom effett fuq il-preċiżjoni jew il-korettezza tar-riżultati bil-ġustifikazzjonijiet xierqa.

4. **IR-REFERENZI**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/-07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 **KOEFFIĊJENT TAL-PARTIZZJONI (1-Ottanol/Ilma): METODU TA' THAWWID BIL-MOD**

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 123 (2006) tal-OECD. Il-valuri ta' koeffiċjent tal-partizzjoni (P_{OW}) ta' 1-ottanol/ilma sa log P_{OW} ta' 8.2 ġew iddeterminati b'mod korrett bil-metodu ta' tħawwid bil-mod (1). Għalhekk dan huwa approċċ sperimentali adattat għad-determinazzjoni diretta ta' P_{OW} ta' sustanzi idrofobiċi ħafna.

2. Metodi oħra għad-determinazzjoni tal-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma (P_{OW}) huma l-metodu ta' 'tħawwid tal-flixkun' (2), u d-determinazzjoni tal-P_{OW} minn mġiba ta' ritenzjoni ta' HPLC ta' faża inversa (3). Il-metodu ta' 'tħawwid tal-flixkun' għandu tendenza għal oġġetti estraneji (artifacts) minħabba t-trasferiment ta' taqtiriet mikro ta' ottanol fil-faża fl-ilma. B'valuri jiżdiedu tal-P_{OW} il-preżenza ta' dawn it-taqtiriet fil-faża fl-ilma twassal għal stima eċċessiva dejjem tiżdied tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fl-ilma. Għalhekk, l-użu tiegħu huwa limitat għal sustanzi b'log $P_{OW} < 4$. It-tieni metodu joqgħod fuq dejta solida ta' valuri P_{OW} iddeterminati direttament biex jikkalibraw ir-relazzjoni bejn mġiba ta' ritenzjoni ta' HPLC u valuri P_{OW} imkejla. Abbozz tal-linja gwida tal-OECD kien disponibbli biex ikunu ddeterminati l-koeffiċjenti tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma ta' sustanzi jonizzabbli (4) iżda m'għandhiex tibqa' tintuża.

3. Dan il-Metodu ta' Ttestjar kien żviluppat fil-Pajjiżi l-Baxxi. Il-preċiżjoni tal-metodi deskritti hawn kienet ivvalidata u ottimizzata fi studju ta' validazzjoni ta' ring-test li fih kienu ħadu sehem 15-il laboratorju (5).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

Sinifikat u użu

4. Għal sustanzi organiċi inerti nstabu relazzjonijiet sinifikanti ħafna bejn koeffiċjenti tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma (P_{OW}) u l-akkumulazzjoni bijoloġika tagħhom fil-ħut. Minbarra dan, intwera li l-P_{OW} huwa korrelatat mat-tossiċità fil-ħut, kif ukoll ma' sorbiment ta' kimiċi għal solidi bħall-ħamrija u s-sedimenti. Fir-referenza (6) ingħatat ħarsa ġenerali estensiva tar-relazzjonijiet.

5. Kienet stabbilita varjetà wiesgħa ta' relazzjonijiet bejn il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma u proprjetajiet oħra ta' sustanzi ta' rilevanza għat-tossikoloġija ambjentali u l-kimika. Bħala konsegwenza, il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma evolva bħala parametru ewlieni fil-valutazzjoni tar-riskju ambjentali tal-kimiċi, kif ukoll fit-tbassir ta' x'jista' jiġri mill-kimiċi fl-ambjent.

Kamp ta' applikazzjoni

6. L-esperiment ta' tħawwid bil-mod jitqies li jnaqqas il-formazzjoni ta' taqtiriet mikro minn taqtiriet ta' 1-ottanol fil-faża tal-ilma. Bħala konsegwenza, ma jkunx hemm stima eċċessiva ta' konċentrazzjoni fl-ilma minħabba molekuli ta' sustanza għall-ittestjar assoċjati ma' taqtiriet bħal dawn. Għalhekk il-metodu ta' tħawwid bil-mod huwa partikolarment adattat għad-determinazzjoni ta' P_{OW} għal sustanzi b'valuri mistennija ta' log P_{OW} ta' 5 u ogħla, li għalihom il-metodu ta' tħawwid tal-flixkun (2) ikollu tendenza li jrendi riżultati żbaljati.

▼M4

DEFINIZZJONI U UNITAJIET

7. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' sustanza bejn ilma u solvent lipofiliku (1-ottanol) jikkaratterizza d-distribuzzjoni tal-ekwilibriju tal-kimika bejn iż-żewġ fażijiet. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni bejn l-ilma u 1-ottanol (P_{OW}) huwa definit bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjonijiet ta' ekwilibriju tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol issaturat bl-ilma (C_O) u ilma ssaturat b'1-ottanol (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Bħala proporzjon ta' konċentrazzjonijiet m'għandux dimensjoni. Spiss jingħata l-bħala l-logaritmu għall-bażi 10 (log P_{OW}). P_{OW} huwa dipendenti mit-temperatura u d-dejta rappurtata għandha tinkludi t-temperatura tal-kejl.

PRINĊIPJU TAL-METODU

8. Biex ikun iddeterminat il-koeffiċjent tal-partizzjoni, l-ilma, 1-ottanol u s-sustanza għall-ittestjar ikunu ekwilibrati ma' xulxin f'temperatura kostanti. Wara jkunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza għall-ittestjar fiż-żewġ fażijiet.

9. Id-diffikultajiet sperimentali assoċjati mal-formazzjoni ta' taqtiriet mikro matul l-esperiment ta' tħawwid tal-flixkun jistgħu jitnaqqsu fl-esperiment ta' tħawwid bil-mod propost hawn. Fl-esperiment ta' tħawwid bil-mod, l-ilma, 1-ottanol u s-sustanza għall-ittestjar ikunu ekwilibrati f'reattur li jħawwad b 'termostat miegħu. L-iskambju bejn il-fażijiet ikun aċċellerat bit-tħawwid. It-tħawwid jintroduċi turbulenza limitata li ssaħħaħ l-iskambju bejn 1-ottanol u l-ilma mingħajr ma jkunu ffurmati taqtiriet mikro (1).

APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

10. Minħabba li l-preżenza ta' sustanzi, minbarra s-sustanza għall-ittestjar, jistgħu jinfluwenzaw il-koeffiċjent ta' attività tas-sustanza għall-ittestjar, is-sustanza għall-ittestjar għandha tkun ittestjata bħala sustanza pura. Għandha tintuża l-ogħla purezza disponibbli kummerċjalment għall-esperiment ta' partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma.

11. Dan il-metodu japplika għal sustanzi puri li ma jiddisassoċjawx jew li jassoċjaw u li ma jurux attività interfaċjali sinifikanti. Jista' jkun applikat biex ikun iddeterminat il-proporzjon ta' partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma għal sustanzi u taħlitiet bħal dawn. Meta l-metodu jintuża għal taħlitiet, il-proporzjonijiet ta' partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma determinati jkunu kondizzjonaLi u dipendenti mill-kompożizzjoni kimika tat-taħlita ttestjata u mill-kompożizzjoni elettrolitika użata bħala fażi fl-ilma. Jekk jittieħdu passi addizzjonali, il-metodu jkun applikabbli wkoll għal komposti li jiddisassoċjaw jew li jassoċjaw (il-paragrafu 12).

12. Minħabba ekwilibriji multipli fl-ilma u f'1-ottanol involuti fil-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma ta' sustanzi li jiddisassoċjaw bħall-aċidi organiċi u l-fenoli, bażijiet organiċi u sustanzi organometalliċi, il-proporzjon ta' partizzjoni 1-ottanol/ilma huwa kostant kondizzjonali dipendenti ħafna mill-kompożizzjoni elettrolitika (7)(8). Id-determinazzjoni tal-proporzjon ta' partizzjoni 1-ottanol/ilma, għalhekk, teħtieġ li l-pH u l-kompożizzjoni elettrolitika jkunu kkontrollati fl-esperiment u rrappurtati. Għandu jkun hemm ġudizzju espert fl-evalwazzjoni ta' dawn il-proporzjonijiet ta' partizzjoni. Billi jintuża l-valur ta' kostant(i) ta' disassoċjazzjoni, ikun meħtieġ li jintgħażlu valuri ta' pH adatti, b'mod li jkun iddeterminat proporzjon ta' partizzjoni għal kull stat ta' jonizzazzjoni. Għandhom jintużaw bafers li ma jikkumplikawx meta jkunu ttestjati komposti organometalliċi (8). B'konsiderazzjoni tat-tagħrif dwar il-kimika fl-ilma (kostanti ta' kumplessazzjoni, kostanti ta' disassoċjazzjoni), il-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jintgħażlu b'mod li tkun tist'a tiġi stmata l-ispeċjazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fil-fażi fl-ilma. Is-saħħa jonika għandha tkun identika fl-esperimenti kollha billi jintuża elettrolit bħala sfond.

▼M4

13. Jistgħu jinqalgħu diffikultajiet fit-test meta jsir it-test għal sustanzi b'solubilità fl-ilma baxxa jew b' P_{OW} għoli minħabba l-fatt li l-konċentrazzjonijiet fl-ilma jsiru baxxi ħafna b'mod li d-determinazzjoni akkurata tagħhom tkun diffiċli. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jipprovdi gwida dwar kif tkun ittrattata din il-problema.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA GĦALL-ITTESTJAR

14. Reaġenti kimiċi għandhom ikunu ta' grad analitiku jew ta' purezza ogħla. Huwa rrakkomandat l-użu ta' sustanzi għall-ittestjar mhux b'tikketta, b'kompożizzjoni kimika magħrufa u preferibbilment b'purezza ta' mill-anqas 99 %, jew ta' sustanzi għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika b'kompożizzjoni kimika magħrufa u b'purezza radjukimika. Fil-każ ta' traċċaturi ta' nofs ħajja qasira, għandhom ikunu applikati l-korrezzjonijiet għad-degradazzjoni. Fil-każ ta' sustanzi għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika, għandu jintuża metodu analitiku speċifiku għal kimika biex ikun żgurat li r-radjuattività tkun relatata direttament mas-sustanza għall-ittestjar.

15. Tista' tinkiseb stima ta' log P_{OW} billi jintuża softwer disponibbli kummerċjalment għal stima ta' log P_{OW}, jew billi jintuża l-proporzjon tas-solubilitajiet fiż-żewġ solventi.

16. Qabel ma jsir esperiment ta' tħawwid bil-mod għad-determinazzjoni ta' P_{OW}, għandha tkun disponibbli l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza għall-ittestjar:

(a) formula strutturali;

(b) metodi analitiċi adatti għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza fl-ilma u 1-ottanol;

(c) kostant(i) ta' disassoċjazzjoni ta' sustanzi jonizzabbli (Linja Gwida 112 tal-OECD (9));

(d) solubilità fl-ilma (10);

(e) idroliżi abijotika] (11);

(f) bijodegradabbiltà faċli (12);

(g) pressjoni tal-fwar (13).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Tagħmir u apparat

17. Ikun meħtieġ tagħmir tal-laboratorju standard, b'mod partikolari, dan li ġej:

— jintużaw ħawwadin manjetiċi u vireg manjetiċi li jħawdu miksijin bit-Teflon biex iħawdu l-faži tal-ilma;

— strumentazzjoni analitika, adattata għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fil-konċentrazzjonijiet mistennija;

— reċipjent għat-tħawwid b'tapp fil-qiegħ. Skont stima tal-log P_{OW} u l-Limitu ta' Detezzjoni (LOD) tal-kompost tat-test, irid jitqies l-użu ta' reċipjent ta' reazzjoni tal-istess ġeometrija akbar minn ta' litru wieħed, biex ikun jista' jinkiseb volum suffiċjenti ta' ilma għall-estrazzjoni u l-analiżi ta' kimika. Dan se jirriżulta f'konċentrazzjonijiet ogħla fl-estratt tal-ilma u b'hekk ikun hemm determinazzjoni analitika aktar affidabbli. Fl-Appendiċi 1 hemm tabella li tagħti stimi tal-volum minimu meħtieġ, il-LOD tal-kompost, l-istima tal-log P_{OW} tiegħu u s-solubilità fl-ilma tiegħu. It-tabella hija bbażata fuq ir-relazzjoni bejn il-log P_{OW} u l-proporzjon bejn is-solubilitajiet f'ottanol u ilma, kif ippreżentat minn Pinsuwan et al. (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

fejn

$SR = S_{oct}/S_w$ (fil-molarità);

u r-relazzjoni mogħtija minn Lyman (15) biex titbassar is-solubilità fl-ilma. Solubilitajiet tal-ilma kkalkulati bl-ekwazzjoni mogħtija fl-Appendiċi 1 għandhom jitqiesu bħala l-ewwel stima. Għandu jkun innotat li l-utent huwa liberu li jiġġenera stima tas-solubilità fl-ilma permezz ta' kwalunkwe relazzjoni li titqies li tirrappreżenta aħjar ir-relazzjoni bejn l-idrofobiċità u s-solubilità. Għal komposti solidi, l-inklużjoni ta' punt ta' tidwib fit-tbassir ta' solubilità hija, pereżempju, irrakomandata. F'każ li tintuża ekwazzjoni modifikata, għandu jkun aċċertat li l-ekwazzjoni għall-kalkulazzjoni ta' solubilità f'ottanol tkun għadha valida. Disinn skematiku ta' reċipjent tat-tħawwid imdawwar bil-ħġieġ b'volum ta' madwar litru wieħed jidher fl-Appendiċi 2. Il-proporzjonijiet tar-reċipjent muri fl-Appendiċi 2 kienu ppruvati li kienu favorevoli u għandhom jinżammu meta jintuża apparat ta' daqs differenti;

— huma essenzjali mezzi biex it-temperatura tinżamm kostanti matul l-esperiment ta' tħawwid bil-mod.

18. Ir-reċipjenti għandhom ikunu magħmulin minn materjal inert b'mod li l-assorbiment mill-uċuħ tar-reċipjenti jkun negliġibbli.

Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet għat-test

19. Id-determinazzjoni tal-P_{OW} għandha ssir b'1-ottanol tal-ogħla purezza li jkun disponibbli kummerċjalment (mill-anqas + 99 %). Hija rrakkomandata purifikazzjoni ta' 1-ottanol b'estrazzjoni bl-aċidu, bażi u ilma u sussegwentement bi tnixxif. Flimkien ma' dan, tista' tintuża distillazzjoni għall-purifikazzjoni ta' 1-ottanol. Għandu jintuża 1-ottanol ippurifikat biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet standard tas-sustanzi għall-ittestjar. L-ilma li għandu jintuża fid-determinazzjoni ta' P_{OW} għandu jkun ħġieġ jew quartz distillat, jew miksub minn sistema ta' purifikazzjoni, jew jista' jintuża ilma ta' grad HPLC. Tkun meħtieġa filtrazzjoni permezz ta' filtru ta' 0,22 μm għall-ilma distillat, u għandhom ikunu inklużi in bjanki biex ikun ivverifikat li fl-estratti konċentrati ma hemmx impuritajiet li jistgħu jkunu ta' tfixkil għas-sustanza għall-ittestjar. Jekk jintuża filtru ta' fibra tal-ħġieġ, dan għandu jitnaddaf billi jinħema għal mill-anqas tliet siegħat f'400 °C.

20. Iż-żewġ solventi jkunu ssaturati reċiprokament qabel l-esperiment billi jkunu ekwilibrati f'reċipjent kbir biżżejjed. Dan isir billi s-sistema f'żewġ fażijiet titħawwad bil-mod għal jumejn.

21. Tintgħażel konċentrazzjoni adattata ta' sustanza għall-ittestjar u tinħall f'1-ottanol (saturat bl-ilma). Il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma jkun jeħtieġlu jiġi ddeterminat f'soluzzjonijiet dilwiti f'1-ottanol u ilma. Għalhekk il-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar m'għandhiex tkun aktar minn 70 % tas-solubilità tagħha b'konċentrazzjoni massima ta' 0,1 M f'wieħed miż-żewġ fażijiet (1). Is-soluzzjonijiet ta' 1-ottanol użati għall-esperiment għandhom ikunu mingħajr sustanza għall-ittestjar solida sospiża.

22. L-ammont adattat ta' sustanza għall-ittestjar jinħall f'1-ottanol (saturat bl-ilma). Jekk l-istima ta' log POW tkun aktar minn ħamsa, għandha tingħata attenzjoni biex is-soluzzjonijiet ta' 1-ottanol użati għall-esperiment ikunu mingħajr sustanza għall-ittestjar solida sospiża. Għal dak il-għan, qed tiġi segwita l-proċedura li ġejja għall-kimiċi b'valur stmat ta' log $P_{OW} > 5$:

— is-sustanza għall-ittestjar tinħall f'1-ottanol (saturat bl-ilma);

▼M4

— is-soluzzjoni tingħata ħin biżżejjed biex is-sustanza solida sospiża toqgħod. Waqt li s-sustanza tkun qed toqgħod, il-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar tiġi mmonitorjata;

— wara li l-konċentrazzjonijiet imkejla fis-soluzzjoni ta' 1-ottanol ikunu kisbu valuri stabbli, is-soluzzjoni stokk tiġi dilwita b'volum adattat ta' 1-ottanol;

— il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni stokk dilwita titkejjel. Jekk il-konċentrazzjoni mkejla tkun konsistenti mad-dilwizzjoni, is-soluzzjoni stokk dilwita tkun tista' tintuża fl-esperiment ta' tħawwid bil-mod.

Estrazzjoni u analiżi ta' kampjuni

23. Għandu jintuża metodu analitiku vvalidat għall-analiżi tas-sustanza għall-ittestjar. L-investigaturi għandhom jipprovdu xhieda li l-konċentrazzjonijiet f'1-ottanol saturat bl-ilma, kif ukoll fil-fażi tal-ilma saturat b'1-ottanol matul l-esperiment ikunu 'l fuq mil-limitu tal-metodu ta' kwantifikazzjoni tal-proċeduri analitiċi użati. L-irkupri analitiċi tas-sustanza għall-ittestjar mill-fażi tal-ilma u mill-fażi ta' 1-ottanol ikun jeħtiġilhom jiġu stabbiliti qabel l-esperiment f'dawk il-każijiet li għalihom ikunu meħtieġa metodi ta' estrazzjoni. Is-sinjal analitiku jkun jeħtieġlu jiġi kkoreġut għal in bjanki u għandha tingħata attenzjoni biex ma jseħħux riporti ta' analita minn kampjun għal ieħor.

24. L-estrazzjoni tal-fażi tal-ilma b'solvent organiku u konċentrazzjoni minn qabel tal-estratt aktarx li jkunu meħtieġa qabel l-analiżi, minħabba konċentrazzjonijiet pjuttost baxxi ta' sustanzi għall-ittestjar idrofobiċi fil-fażi tal-ilma. Għall-istess raġuni jkun meħtieġ li jitnaqqsu l-konċentrazzjonijiet in bjank eventwali. Għal dak il-għan, ikun meħtieġ li jintużaw solventi ta' purezza għolja, preferibbilment solventi għall-analiżi tar-residwi. Minbarra dan, li wieħed jaħdem b'oġġetti tal-ħġieġ maħsulin sew minn qabel (eż. ħasil b'solventi jew ħami f'temperatura għolja) jgħin biex tkun evitata l-kontaminazzjoni kroċjata.

25. Stima tal-log P_{OW} tista' tinkiseb minn programm ta' stima jew permezz ta' ġudizzju espert. Jekk il-valur ikun ogħla minn sitta, f'dak il-każ korrezzjonijiet in bjank u r-riporti analita jeħtieġu jkunu mmonitorjati mill-qrib. Bl-istess mod, jekk l-istima ta' log P_{OW} tkun aktar minn sitta, l-użu ta' standard sostitut għall-korrezzjoni ta' rkupru huwa obbligatorju, biex ikunu jistgħu jintlaħqu fatturi ta' konċentrazzjoni minn qabel. Huma kummerċjalment disponibbli għadd ta' programmi tas-softwer għall-istima tal-log P_{OW} [1], eż. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) u ACD log P (19). Id-deskrizzjonijiet tal-approċċi tal-stima jinsabu fir-referenzi (20-22).

26. Il-limiti ta' kwantifikazzjoni (LOQ) għad-determinazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol u l-ilma huma stabbiliti bl-użu ta' metodi aċċettati. Bħala regola bażika, il-limitu tal-metodu ta' kwantifikazzjoni jista' jkun iddeterminat bħala l-konċentrazzjoni fl-ilma jew f'1-ottanol li tipproduċi proporzjon ta' sinjal għal ħoss ta' għaxra. Għandu jintgħażel metodu adattat ta' estrazzjoni u konċentrazzjoni minn qabel u l-irkupri analitiċi għandhom jiġu speċifikati wkoll. Jintgħażel fattur adattat ta' konċentrazzjoni minn qabel biex jinkiseb sinjal tad-daqs meħtieġ malli jkun hemm determinazzjoni analitika.

[1] Din l-informazzjoni tingħata biss għall-konvenjenza ta' min jużahom. Programmi oħra ekwivalenti tal-kompjuter jistgħu jintużaw jekk ikun jista' jintwera li jipproduċu l-istess riżultati.

▼M4

27. Abbażi tal-parametri tal-metodu analitiku u tal-konċentrazzjonijiet mistennija, jiġi ddeterminat daqs approssimattiv tal-kampjun meħtieġ għad-determinazzjoni korretta tal-konċentrazzjoni kompost. Għandu jkun evitat l-użu ta' kampjuni tal-ilma li jkunu wisq żgħar biex jinkiseb sinjal analitiku suffiċjenti. Għandu jkun evitat ukoll l-użu ta' kampjuni tal-ilma li jkunu eċċessivament kbar, għax inkella jista' jkun li jifdal ftit wisq ilma għal għadd minimu ta' analiżi meħtieġa (n = 5). Fl-Appendiċi 1, il-volum minimu tal-kampjuni huwa indikat bħala funzjoni tal-volum tar-reċipjent, l-LOD tas-sustanza għall-ittestjar u s-solubilità tas-sustanza għall-ittestjar.

28. Il-kwantifikazzjoni tas-sustanzi għall-ittestjar isseħħ b'paragun mal-kurvi ta' kalibrazzjoni tal-kompost rispettiv. Il-konċentrazzjonijiet fil-kampjuni analizzati għandhom ikunu kkategorizzati skont il-konċentrazzjonijiet tal-istandards.

29. Għal sustanzi għall-ittestjar bi stima tal-log P_{OW} ogħla minn sitta, għandu jitħallat standard sostitut mal-ilma qabel l-estrazzjoni sabiex ikun irreġistrat it-telf li jseħħ matul l-estrazzjoni u l-konċentrazzjoni minn qabel tal-kampjuni tal-ilma. Għal korrezzjoni korretta tal-irkupri, is-sostituti għandu jkollhom proprjetajiet li jkunu qrib ħafna ta', jew identiċi għal dawk tas-sustanza għall-ittestjar. Preferibbilment, għal dan il-għan jintużaw analogi b'tikketti isotopiċi (stabbli) tas-sustanzi ta' interess (pereżempju, perdewterat jew b'tikketti ^{13}C). Jekk l-użu ta' isotopi stabbli b'tikketta, jiġifieri ^{13}C jew ^{2}H, ma jkunx possibbli, għandu jintwera minn dejta affidabbli fil-letteratura li l-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sostitut huma qrib ħafna ta' dawk tas-sustanza għall-ittestjar. Matul l-estrazzjoni ta' likwidu-likwidu tal-faži tal-ilma jistgħu jifformaw l-emulsjonijiet. Dawn jistgħu jitnaqqsu billi jiżdied il-melħ u l-emulsjoni titħalla toqgħod matul il-lejl. Il-metodi użati għall-estrazzjoni u għall-konċentrazzjoni minn qabel tal-kampjuni jeħtiġilhom ikunu rrappurtati.

30. Il-kampjuni meħudin mill-faži ta' 1-ottanol jistgħu, jekk ikun meħtieġ, jiġu dilwiti b'solvent adattat qabel l-analiżi. Minbarra dan, huwa rrakkomandat l-użu ta' standards sostituti għal korrezzjoni ta' rkupri għal sustanzi li għalihom l-esperimenti ta' rkupru jkunu wrew grad għoli ta' varjazzjoni fl-esperimenti ta' rkupru (devjazzjoni standard relattiva > 10 %).

31. Id-dettalji tal-metodu analitiku jeħtiġilhom ikunu rrappurtati. Dan jinkludi l-metodu tal-estrazzjoni, il-konċentrazzjoni minn qabel u fatturi ta' dilwizzjoni, parametri ta' strumenti, rutina ta' kalibrazzjoni, firxa ta' kalibrazzjoni, irkupru analitiku tas-sustanza għall-ittestjar mill-ilma, żieda ta' standards sostituti għal korrezzjoni ta' rkupri, valuri in bjank, limiti ta' detezzjoni u limiti ta' kwantifikazzjoni.

Prestazzjoni tat-Test

Proporzjonijiet ottimi tal-volum ta' 1-ottanol/ilma

32. Fl-għażla tal-volumi ta' ilma u 1-ottanol, għandhom jitqiesu l-LOQ f'1-ottanol u l-ilma, il-fatturi ta' konċentrazzjoni minn qabel applikati lill-kampjuni tal-ilma, il-volumi li tagħhom ikunu ttieħdu l-kampjuni f'1-ottanol u l-ilma, u l-konċentrazzjonijiet mistennija. Għal raġunijiet ta' sperimentazzjoni, il-volum ta' 1-ottanol fis-sistema ta' tħawwid bil-mod għandha tintgħażel b'mod li s-saff ta' 1-ottanol ikun oħxon biżżejjed (> 0,5 cm) sabiex jippermetti t-teħid ta' kampjuni tal-faži ta' 1-ottanol mingħajr ma jiddisturbah.

33. Il-proporzjonijiet tipiċi tal-fażijiet għad-determinazzjonijiet ta' komposti b'log P_{OW} ta' 4,5 u ogħla huma 20 sa 50 ml ta' 1-ottanol u 950 sa 980 ml ta' ilma f'reċipjent ta' litru wieħed.

▼M4

Kundizzjonijiet tat-test

34. Matul it-test ir-reċipjent tar-reazzjoni għandu termostat biex inaqqas il-varjazzjoni tat-temperatura għal inqas minn 1 °C. L-analiżi għandha titwettaq f'25 °C.

35. Is-sistema sperimentali għandha tkun protetta mid-dawl naturali billi l-esperiment isir f'kamra mudlama jew billi r-reċipjent ta' reazzjoni jitgħatta b'folja tal-aluminju.

36. L-esperiment għandu jsir f'ambjent ħieles (kemm jista' jkun) mit-trab.

37. Is-sistema ta' 1-ottanol-ilma titħawwad sakemm jinkiseb ekwilibriju. F'esperiment pilota jkun ivvalutat it-tul tal-perjodu ta' ekwilibrazzjoni billi jsir esperiment ta' tħawwid bil-mod u perjodikament jittieħed kampjun tal-ilma u ta' 1-ottanol. Il-punti ta' ħin ta' teħid ta' kampjun għandhom jitqassmu f'perjodu minimu ta' ħames sigħat.

38. Kull determinazzjoni tal-P_{OW} għandha ssir billi jsiru mill-anqas tliet esperimenti indipendenti ta' tħawwid bil-mod.

Determinazzjoni tal-ħin ta' ekwilibrazzjoni

39. Huwa preżunt li l-ekwilibriju jinkiseb meta rigressjoni tal-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' 1-ottanol/ilma mal-ħin tul intervall ta' ħin ta' erba' punti ta' ħin trendi angolu li ma jkunx differenti b'mod sinifikanti minn żero f'livell p ta' 0,05. Il-ħin minimu ta' ekwilibrazzjoni huwa ta' jum qabel ma jinbeda jittieħed il-kampjun. Bħala regola, it-teħid ta' kampjuni ta' sustanzi bi stima ta' log P_{OW} ta' anqas minn ħamsa jista' jsir matul it-tieni u t-tielet jum. L-ekwilibrazzjoni jista' jkollha tkun estiża għal komposti aktar idrofobiċi. Għal kompost b'log P_{OW} ta' 8,23 (dekakloro-bifenil) 144 siegħa kienu suffiċjenti għal ekwilibrazzjoni. L-ekwilibriju jiġi vvalutat permezz ta' teħid ripetut ta' kampjuni ta' reċipjent wieħed.

Bidu tal-esperiment

40. Fil-bidu tal-esperiment ir-reċipjent ta' reazzjoni jimtela bl0ilma saturat b'1-ottanol. Għandu jitħalla jkun hemm ħin biżżejjed biex tintlaħaq it-temperatura tat-termostat.

41. L-ammont mixtieq ta' sustanza għall-ittestjar (maħlula fil-volum meħtieġ ta' 1-ottanol saturat bl-ilma) tiżdied b'attenzjoni fir-reċipjent ta' reazzjoni. Dan huwa stadju kruċjali fl-esperiment, minħabba li għandu jkun evitat it-taħlit b'turbulenza taż-żewġ fażijiet. Għal dak il-għan, il-fażi ta' 1-ottanol tista' tgħaddi bil-mod minn pipetta mal-ħajt tar-reċipjent sperimentali, qrib il-wiċċ tal-ilma. Wara tgħaddi fi fluss tul il-ħajt tal-ħġieġ u tifforma rita 'l fuq mill-fażi tal-ilma. Id-dikantar ta' 1-ottanol direttament fil-flixkun għandu dejjem jiġi evitat; it-taqtiriet ta' 1-ottanol m'għandhomx jitħallew jaqgħu direttament fl-ilma.

42. Wara li jibda t-tħawwid, ir-rata ta' tħawwid għandha tiżdied bil-mod. Jekk il-muturi tat-tħawwid ma jkunux jistgħu jiġu aġġustati sewwa għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' trasformatur. Ir-rata ta' tħawwid għandha tiġi aġġustat sabiex tinħoloq il-vortiċi fil-interfaċċa bejn l-ilma u 1-ottanol ta' fond ta' 0,5 għal massimu ta' 2,5 cm. Ir-rata ta' tħawwid għandha titnaqqas jekk il-fond tal-vortiċi jaqbeż it-2,5 cm; inkella jistgħu jifformaw taqtiriet mikro mit-taqtiriet ta' 1-ottanol fil-fażi tal-ilma, li jwassal għal stima eċċessiva tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fl-ilma. Hija rrakkomandata r-rata massima ta' tħawwid ta' 2,5 cm abbażi tas-sejbiet fl-istudju ta' validazzjoni tar-ring-test (5). Huwa kompromess bejn il-kisba ta' rata mgħaġġla ta' ekwilibrazzjoni, filwaqt li tkun illimitata l-formazzjoni ta' taqtiriet mikro ta' 1-ottanol.

▼M4

Teħid ta' Kampjuni u Trattament tal-Kampjuni

43. Il-ħawwad għandu jintefa qabel ma jittieħdu l-kampjuni u l-likwidi għandhom jitħallew jieqfu milli jiċċaqalqu. Wara li jitlesta t-teħid tal-kampjuni, il-ħawwad jerġa' jitqabbad bil-mod, kif deskritt hawn fuq, u mbagħad ir-rata ta' tħawwid tiżdied gradwalment.

44. Il-fażi tal-ilma jitteħdilha kampjun minn rubinett tal-għeluq fil-qiegħ tar-reċipjent ta' reazzjoni. Skarta dejjem il-volum mejjet ta' ilma li jkun hemm fil-vitijiet (madwar 5 ml fir-reċipjent muri fl-Appendiċi 2). L-ilma fil-vitijiet ma jitħawwadx u, għalhekk, ma jkunx f'ekwilibriju mal-bulk. Innota l-volum tal-kampjuni tal-ilma, u żgura li jitqies l-ammont ta' sustanza għall-ittestjar li jkun hemm fl-ilma skartat meta tiffissa bilanċ tal-massa. It-telfiet minħabba l-evaporazzjoni għandhom ikunu mminimizzati billi l-ilma jitħalla jgħaddi fi fluss mingħajr taqlib fil-lembut separatorju, b'mod li ma jkunx hemm disturb tas-saff tal-ilma/1-ottanol.

45. Il-kampjuni ta' 1-ottanol jinkisbu billi tittieħed alikwota żgħira (madwar 100 µl) mis-saff ta' 1-ottanol b'siringa ta' 100 mikrolitru kollha kemm hija tal-ħġieġ u l-metall. Għandha tingħata attenzjoni li l-limitu ma jitqallibx. Il-volum tal-likwidu li jkun itteħiedlu kampjun jiġi rreġistrat. Alikwota żgħira hija biżżejjed, minħabba li l-kampjun ta' 1-ottanol se jiġi dilwit.

46. Stadji mhux meħtieġa ta' trasferiment ta' kampjuni għandhom ikunu evitati. Għal dak il-għan il-volum ta' kampjun għandu jkun iddeterminat b'mod gravimetriku. F'każ ta' kampjuni ta' ilma dan ikun jista' jinkiseb bil-ġbir tal-kampjun tal-ilma f'lembut separatorju li jkun diġà fih il-volum meħtieġ ta' solvent.

DEJTA U RAPPURTAR

47. Skont dan il-Metodu ta' Ttestjar, P_{OW} ikun iddeterminat billi jsiru tliet esperimenti ta' tħawwid bil-mod (tliet unitajiet sperimentali) bil-kompost li jkun qed jiġi investigat li juża kundizzjonijiet identiċi. Ir-rigressjoni użata biex jintwera li jkun inkiseb ekwilibriju għandha tkun ibbażata fuq ir-riżultati ta' mill-anqas erba' determinazzjonijiet ta' C_O/C_W f'punti konsekuttivi ta' ħin. Dan jippermetti li tkun ikkalkulata varjanza bħala kejl tal-inċertezza tal-valur medju miksub minn kull unità sperimentali.

48. Il-P_{OW} jista' jiġi kkaratterizzat mill-varjanza fid-dejta miksuba għal kull unità sperimentali. Din l-informazzjoni tintuża biex ikun ikkalkulat il-P_{OW} bħala l-medja peżata tar-riżultati tal-unitajiet sperimentali individwali. Biex isir dan, jintuża bħala piż l-invers tal-varjanza tar-riżultati tal-unitajiet sperimentali. Bħala riżultat, dejta b'varjazzjoni kbira (espressa bħala l-varjanza) u, għalhekk, b'anqas affidabbiltà, ikollha anqas influwenza fuq ir-riżultat minn dejta b'varjanza baxxa.

49. B'mod analoġiku, tiġi kkalkulata d-devjazzjoni standard peżata. Din tikkaratterizza r-ripetibbiltà tal-kejl tal-P_{OW}. Valur baxx tad-devjazzjoni standard peżata jindika li d-determinazzjoni tal-P_{OW} kienet ripetibbli ħafna f'laboratorju wieħed. It-trattament formali tal-istatistika tad-dejta jinsab spjegat hawn taħt.

▼M4

Trattament tar-riżultati

Wiri ta' kisba ta' ekwilibriju

50. Il-logaritmu tal-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol u ilma (log (C_O/C_w)) huwa kkalkulat għal kull ħin ta' teħid ta' kampjuni. Il-kisba ta' ekwilibriju kimiku tintwera billi dan il-proporzjon jitfassal f'konfront mal-ħin. Livell kostanti f'din il-grafika li jkun ibbażat f'mill-anqas fuq erba' punti konsekuttivi ta' ħin jindika li jkun inkiseb ekwilibriju, u li l-kompost ikun inħall tassew f'1-ottanol. Jekk le, it-test ikun jeħtieġlu jitkompla sakemm erba' punti suċċessivi ta' ħin jrendu angolu li ma jkunx differenti b'mod sinifikanti minn 0 f'livell p ta' 0,05, li jindika li log C_O/C_w huwa indipendenti mill-ħin.

Kalkolu ta' Log P_{OW}

51. Il-valur ta' log P_{OW} tal-unità sperimentali huwa kkalkulat bħala l-valur medju peżat ta' log C_o/C_w għall-parti tal-kurva ta' log C_o/C_w vs il-ħin, li għalih ikun intwera l-ekwilibriju. Il-medja peżata hija kkalkulata billi d-dejta tintiżen mal-invers tal-varjanza sabiex l-influwenza tad-dejta fuq ir-riżultat finali tkun proporzjonata b'mod invers għall-inċertezza fid-dejta.

Medja ta' log P_{OW}

52. Il-valur medju ta' log P_{OW} ta' unitajiet sperimentali differenti huwa kkalkulat bħala l-medja tar-riżultati tal-unitajiet sperimentali individwali ppeżati mal-varjanzi rispettivi tagħhom.

Il-kalkulazzjoni ssir kif ġej:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

fejn

$\log P_{OW,i}$ = il-valur log P_{OW} tal-unità sperimentali i individwali;

$\log P_{OW,Av}$ = il-valur medju peżat tad-determinazzjonijiet log P_{OW} individwali;

w_i = il-piż statistiku assenjat lil valur log P_{OW} tal-unità sperimentali i.

Ir-reċiproku tal-varjanza ta' log $P_{OW,i}$ jintuża bħala w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. L-iżball tal-medja ta' log P_{OW} huma stmat bħala r-ripetibbiltà ta' log C_o/C_w iddeterminat matul il-fażi ta' ekwilibriju fl-unitajiet sperimentali individwali. Huwa espress bħala d-devjazzjoni standard peżata ta' log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) li mbagħad ikun kejl tal-iżball assoċjat ma' log $P_{OW,Av}$. Id-devjazzjoni standard peżata tista' tiġi kkomputata mill-varjanza peżata $\text{var}_{\log Pow,Av}$ kif ġej:

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Is-simbolu n huwa għall-għadd ta' unitajiet sperimentali.

▼M4

Rapport tat-test

54. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza għall-ittestjar:

— isem komuni, isem tal-kimika, numru tal-CAS, formula strutturali (li tindika l-pożizzjoni tat-tikketta meta tintuża sustanza b'tikketta radjoloġika) u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti (ara l-paragrafu 17);

— purezza (impuritajiet) tas-sustanza għall-ittestjar;

— purezza tat-tikketta ta' kimiċi b'tikketta u attività molari (fejn jixraq);

— stima preliminari ta' log P_{ow}, kif ukoll il-metodu użat biex joħroġ il-valur.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dati tat-twettiq tal-istudji;

— temperatura matul l-esperiment;

— volumi ta' 1-ottanol u ilma fil-bidu tat-test;

— volumi ta' kampjuni meħudin ta' 1-ottanol u ilma;

— volumi ta' 1-ottanol u ilma li jifdal fir-reċipjenti tat-test;

— deskrizzjoni tar-reċipjenti tat-test u tal-kundizzjonijiet tat-tħawwid (ġeometrija tal-virga tat-tħawwid u tar-reċipjent tat-test, l-għoli tal-vortiċi f'mm, u meta disponibbli: rata ta' tħawwid) użati;

— metodi analitiċi użati biex ikunu ddeterminati s-sustanza għall-ittestjar u l-limitu tal-metodu ta' kwantifikazzjoni;

— ħinijiet ta' teħid ta' kampjuni;

— il-pH tal-faża fl-ilma u l-bafers użati, meta l-pH ikun aġġustat għal molekuli jonizzabbli;

— għadd ta' replikati.

Riżultati:

— ripetibbiltà u sensittività tal-metodi analitiċi użati;

— konċentrazzjonijiet iddeterminati tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol u ilma bħala funzjoni ta' ħin;

— wiri ta' bilanċ tal-massa;

— temperatura u devjazzjoni standard jew il-firxa tat-temperatura matul l-esperiment;

— ir-rigressjoni tal-proporzjon ta' konċentrazzjoni f'konfront mal-ħin;

— il-valur medju ta' log $P_{ow,Av}$ u l-iżball standard tiegħu;

— diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;

▼M4

— eżempji ta' ċifri ta' dejta mhux maħduma ta' analiżi rappreżentattiva (id-dejta kollha mhux maħduma għandha tinħażen skont standards tal-GLP), inklużi rkupri ta' sostituti, u l-għadd ta' livelli użati fil-kalibrazzjoni (flimkien mal-kriterji għall-koeffiċjent ta' korrelazzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni), u r-riżultati ta' garanzija tal-kwalità/kontroll tal-kwalità (QA/QC);

— meta disponibbli: rapport ta' validazzjoni tal-proċedura ta' analiżi (li għandu jkun indikat fost ir-referenzi).

LETTERATURA:

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) Il-Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness, Koeffiċjent tal-Partizzjoni.

(3) Il-Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness, Koeffiċjent tal-Partizzjoni.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) Il-Kapitolu A.6 ta' dan l-Anness, Solubilità tal-Ilma.

(11) Il-Kapitolu C.7 ta' dan l-Anness, Degradazzjoni – Idroliżi ta' Degradazzjoni Abijotika bħala Funzjoni ta' pH.

(12) Il-Kapitolu C.4 - Parti II – VII (Metodu A sa F) ta' dan l-Anness, Determinazzjoni ta' Bijodegradabilità 'Faċli'.

(13) Il-Kapitolu A.4 ta' dan l-Anness, Pressjoni tal-Fwar.

(14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Kanada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther*. 14: 479-488.

(22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Appendiċi 1

Spreadsheet għall-komputazzjoni ta' volumi minimi ta' ilma meħtieġ għall-detezzjoni ta' sustanzi għall-ittestjar ta' valuri differenti ta' log P_{OW} fil-fażi fl-ilma

Suppożizzjonijiet:

— Volum massimu ta' alikwoti individwali = 10 % tal-volum totali; 5 alikwoti = 50 % tal-volum totali.

— Koncentrazzjoni ta' sustanzi għall-ittestjar = 0,7 × solubilità f'fazi waħda jew oħra. F'każ ta' konċentrazzjonijiet aktar baxxi, ikunu meħtieġa volumi akbar.

— Volum użat għal determinazzjoni ta' LOD = 100 ml.

— log P_{ow} vs. log S_w u log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) huma rappreżentazzjonijiet raġonevoli ta'relazzjonijiet għal sustanzi għall-ittestjar.

Stima ta' S_w

log P_{ow}	ekwazzjoni	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 0,887	1,297E-01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 1,809	1,552E-02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 2,731	1,858E-03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	– 3,192	6,427E-04

Stima ta' S_{oct}

log P_{ow}	ekwazzjoni	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Total tal-Massa tas-sustanza għall-ittestjar (mg)	$Massa_{oct}/Massa_{ilma}$	$Massa_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Massa_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Komputazzjoni ta' volumi

Volum minimu meħtieġ għal faża ta' H_2O f'kull konċentrazzjoni ta' LOD

log K_{ow}	LOD (mikrogrammi/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volum użat għal LOD (l)	0,1					

Spjegazzjoni tal-Komputazzjonijiet

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' faża fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 1 litru.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' faża fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 2 litri.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' faża fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 5 litri.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' faża fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 10 litri.

Jeċċedi l-10 % ta' reċipjent ta' ekwilibrazzjoni anke tal-10 litri.

▼M4

Prospett ta' volumi meħtieġa, bħala funzjoni ta' solubilità fl-ilma u Log P_{ow}

Volum minimu meħtieġ għal fażi ta' H_2O f'kull konċentrazzjoni ta' LOD (ml)

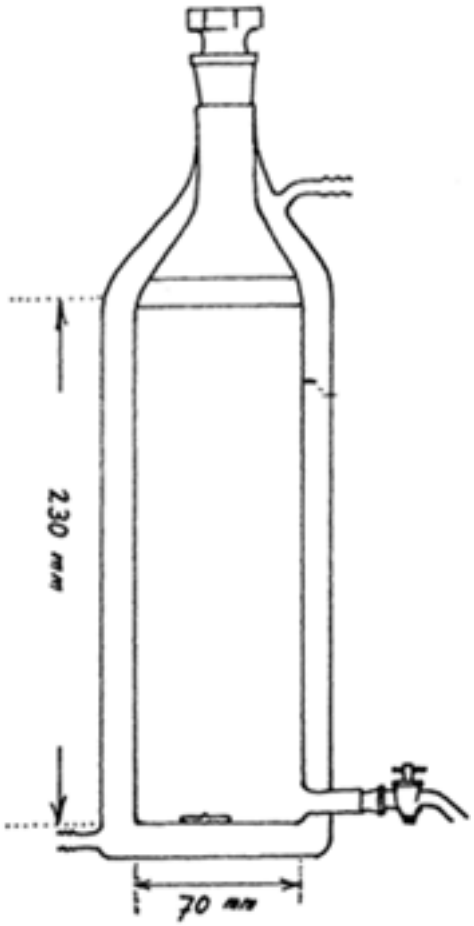
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volum użat għal LOD (l)		0,1					

Appendiċi 2

Eżempju ta' reċipjent tat-test imdawwar bil-ħġieġ għall-esperiment ta' tħawwid bil-mod għal determinazzjoni ta' P_{OW}



▼B

PARTI B: METODI GĦAD-DETERMINAZZJONI TAT-TOSSIĊITÀ U EFFETTI OĦRA TAS-SAĦĦA

WERREJ

DAĦLA ĠENERALI

B.1.bis. TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA – PROĊEDURA GĦAL DOŻA FISSA

B.1.tris. TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA – METODU TAL-KLASSIFIKA TOSSIKA AKUTA

B.2. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA

B.3. TOSSIĊITÀ AKUTA (DERMALI)

B.4. TOSSIĊITÀ AKUTA: IRRITAZZJONI/KORRUŻJONI TAL-ĠILDA

B.5. TOSSIĊITÀ AKUTA: IRRITAZZJONI/KORRUŻJONI TA' L-GĦAJNEJN

B.6. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA

B.7. STUDJU DWAR IT-TOSSIĊITÀ ORALI TA' DOŻA RIPETUTA KULL 28 JUM FIR-RODITURI

B.8. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI SUBAKUTA: STUDJU TA' 28 JUM

B.9. DOŻI REPETUTI (28 jum) TOSSIĊITÀ (DERMALI)

B.10. MUTAĠENIĊITÀ – TEST *IN VITRO* DWAR ANORMALITÀ FIL-KROMOŻOMI TAL-MAMMIFERI

B.11. MUTAĠENIĊITÀ – TEST *IN VIVO* DWAR ANORMALITÀ FIL-KROMOŻOMI TAL-MUDULLUN TAL-MAMMIFERI

B.12. MUTAĠENIĊITÀ – TEST MIKRONUKLEU *IN VIVO* GĦAL ERITROĊITE FIL-MAMMIFERI

B.13/14. MUTAĠENIĊITÀ – TEST TA' MUTAZZJONI RIVERSIVA TA' BATTERJI

B.15. IT-TIBDIL TAL-ĠENE – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.16. IR-RIKOMBINAZZJONI MITOTISTA – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.17. MUTAĠENEĊITÀ – TEST TAL-MUTAZZJONI TAL-ĠENE TAĊ-ĊELLULA TAL-MAMMIFERI *IN VITRO*

B.18. DANNI U RIMEDJI TAD-DNA – SINTESI MHUX FL-ISKEDA TAD-DNA – ĊELLULI MAMMIFERI *IN VITRO*

B.19. ANALIŻI *IN VITRO* TA' L-ISKAMBJU TA' KROMATID OĦT

B.20. TEST REESSIV LI JIKKAĠUNA L-MEWT U LI HUWA SKOND IS-SESS F'*DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21.	TEST TAT-TIBDIL TAL-ĠENI F'ĊELLULI MAMMIFERI *IN VITRO*
B.22.	TEST LETALI DOMINANTI TAL-MAMMALI ĠERRIERA
B.23.	TEST DWAR ANORMALITÀ FIL-KROMOŻOMI SPERMATOGONI TAL-MAMMIFERI
B.24.	TEST TAT-TIKEK FIL-PIL TAL-ĠRIEDEN
B.25.	IT-TRASLOKAZZJONI TAL-ĠRIEDEN LI TITTIEĦED
B.26.	EŻAMI TA' TOSSIĊITA ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻA GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊJI TA' ANNIMALI GERRIEMA
B.27.	EŻAMI TA' TOSSIĊITÀ ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻI GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊI TA' ANNIMALI MHUX GERRIEMA
B.28.	STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ DERMALI SUB-KRONIKA STUDJU DERMALI TAD- DOŻA RIPETUT GĦAL 90 ĠURNATA LI JUŻA SPEĊI TA' MAMMALI GERRIEMA
B.29.	TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI SUBKRONIKA: STUDJU TA' 90 JUM
B.30.	STUDJI DWAR TOSSIĊITÀ KRONIKA
B.31.	STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ FL-IŻVILUPP PRENATALI
B.32.	STUDJI DWAR IL-KARĊINOĠENIĊITÀ
B.33.	STUDJI KONĠUNTI DWAR TOSSIĊITÀ KRONIKA/KARĊINOĠENIĊITÀ
B.34.	TEST TA' TOSSIĊITÀ FUQ IR-RIPRODUZZJONI FUQ ĠENERAZZJONI WAĦDA
B.35.	STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ REPRODUTTIVA FUQ ŻEWĠ ĠENERAZZJONIJIET
B.36.	TOSSIKOKINETIĊI
B.37.	ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIĊITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* WARA L-ESPOŻIZZJONI AKUTA
B.38.	ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIĊITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* STUDJU TA' DOŻA RIPETUTTA GĦAL 28 ĠURNATA
B.39.	TEST *IN VIVO* TA' SINTESI MHUX PROGRAMMATA TA' DNA (UDS) FUQ ĊELLULI TAL-FWIED TAL-MAMMIFERI
B.40.	IL-KORROŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANJA (TER – TRANSCUTANEAL ELECTRICAL RESISTANCE)
B.40.BIS.	IL-KORROŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAL-MUDELL TAL-ĠILDA UMANA

▼B

B.41. IT-TEST TAL-FOTOTOSSIĊITÀ *IN VITRO* 3T3 NRU

B.42. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULA TAL-LIMFA LOKALI

B.43. STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSIĊITÁ FL-ANNIMALI GERRIEMA

B.44. L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VIVO*

B.45. L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VITRO*

B.46. IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-EPIDERMIDE UMANA RIKOSTRUWITA

B.47. IL-METODU TA' TTESTJAR TAL-OPAĊITÀ U TAL-PERMEABILITÀ TAL-KORNEA TAL-BOVINI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KORRUŻIVI U IRRITANTI SEVERI GĦALL-GĦAJNEJN

B.48. METODU TA' TTESTJAR TA' GĦAJNEJN TAT-TIĠIEĠ IŻOLATI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KORRUŻIVI U IRRITANTI SEVERI GĦALL-GĦAJNEJN

B.49. TEST TAL-MIKRONUKLEU TAĊ-ĊELLOLA MAMMIFERA *IN VITRO*

B.50. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODI TAL-LIMFA LOKALI: DA

B.51. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULU LIMFATIKU LOKALI BRDU-ELISA

▼M4

B.52. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA – METODU TA' KLASSI AKUTA TOSSIKA

▼B

DAĦLA ĠENERALI

A. KARATTERIZZAZZJONI TAS-SUSTANZA GĦAT-TEST

Il-kompożizzjoni tas-sustanza għat-test, inklużi l-impuritajiet l-iktar importanti, u l-proprjetajiet fiżiko-kimiċi relevanti tagħha inkluża l-istabilità, għandha tkun magħrufa qabel il-bidu ta' kwalunkwe studju għat-tossiċità.

Il-proprjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza għat-test jagħtu informazzjoni importanti fl-għażla election of the route of administration, the design of each particular study and the handling and storage of the test substance.

L-iżvilupp ta' metodu analitiku għad-determinazzjoni tas-sustanza għat-test (inklużi l-impuritajiet prinċipali meta hu possibbli) fil-midjum tad-dożaġġ u l-materjal bijoloġiku għandu jiġi qabel il-bidu ta' l-istudju.

L-informazzjoni kollha li għandha x'taqsam ma' l-identifikazzjoni, il-proprjetajiet fiżiko-kimiċi, il-purità, u l-imġiba tas-sustanza għat-test għandhom jiġu inklużi fir-rapport tat-test.

B. KURA TA' L-ANNIMALI

Il-kontroll strett tal-kundizzjonijiet ambjentali u l-kura b'sengħa ta' l-annimali huma essenzjali fl-ittestjar tat-tossiċità

(i) *Il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew l-annimali*

Il-kundizzjonijiet ambjentali fil-kmamar sperimentali jew l-ispazji magħluqa ta' l-annimali għandhom ikunu xierqa għall-ispeċi li se jiġu ttestjati. Għall-firien, ġrieden u fniek ta' l-indi, il-kundizzjonijiet xierqa huma temperatura tal-kamra ta' 22 °C ± 3 °C b'umdità relattiva minn 30 sa 70 %; għall-fniek it-temperatura għandha tkun ta' 20 °C ± 3 °C b'umdità relattiva minn 30 sa 70 %.

Ċerti tekniki sperimentali huma partikularment sensittivi għall-effetti tat-temperatura u, f'dawn il-każijiet, id-dettalji tal-kundizzjonijiet xierqa huma inklużi fid-deskrizzjoni tal-metodu tat-test. Fl-investigazzjonijiet kollha ta' l-effetti tossiċi, it-temperatura u l-umdità għandhom jiġu mmoniterjati, irrekordjati, u inklużi fir-raport finali ta' l-istudju.

Id-dwal għandhom ikunu artifiċjali, is-sekwenza għandha tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Id-dettalji tas-sekwenza tad-dwal għandhom jiġu rrekordjati u inklużi fir-rapport finali ta' l-istudju.

Sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor fil-metodu, l-annimali jistgħu jitpoġġew individwalment, jew jinqaflu fi gruppi żgħar ta' l-istess sess; biex jinqaflu fi grupp, m'għandux ikun hemm iktar minn ħames annimali f'kull gaġġa.

Fir-rapporti ta' l-esperimenti fuq l-annimali, huwa importanti li jidher ċar kif qed jiġu maqfula l-annimali u n-numru ta' annimali mpoġġija f'kull gaġġa kemm waqt l-espożizzjoni għall-kimika u kemm waqt kwalunkwe perjodu ta' osservazzjoni li jiġi wara.

▼B

(ii) *Kundizzjonijiet ta' l-għalf*

Id-dieti għandhom jissodisfaw il-ħtiġiet nutrizzjonali kollha ta' l-ispeċi li qed jiġu ttestjati. Fejn jiġu amministrati s-sustanzi għat-test fid-dieta ta' l-annimali il-valur nutrizzjonali jista' jonqos permezz ta' l-effett li s-sustanza u l-kostitwent tad-dieta jagħmlu fuq xulxin. Il-possibbiltà ta' reazzjoni bħal din għandha tiġi meqjusa meta jiġu interpretati ir-riżultati tat-testijiet. Id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu jintużaw b'forniment illimitat ta' ilma għax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mil-ħtieġa li tiġi żgurata taħlita xierqa tas-sustanza għat-test meta tiġi somministrata b'dan il-metodu.

Il-kontaminanti tad-dieta li jinfluwenzaw it-tossiċità m'għandhomx ikunu preżenti f'konċentrazzjonijiet li jinterferixxu.

C. **ITTESTJAR ALTERNATTIV**

L-Unjoni Ewropea għandha l-impenn li tippromwovi l-iżvilupp u l-validazzjoni ta' tekniki alternattivi li jistgħu jipprovdu l-istess livell ta' informazzjoni bħala testijiet kurrenti għall-annimali, iżda li jużaw inqas annimali, jikkawżaw inqas tbatija jew jevitaw kompletament l-użu ta' annimali.

Metodi bħal dawn, meta jsiru disponibbli, għandhom jiġu kkunsidrati fejn hu possibbli għall-karatterizzazzjoni tal-periklu u l-klassifikazzjoni u l-ittikettjar konsegwenti għall-perikli intrinsiċi u l-valutazzjoni għas-sigurtà tal-kimika.

D. **EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI**

Meta t-testijiet jiġu evalwati u interpretati, il-limitazzjonijiet safejn ir-riżultati ta' l-istudji ta' l-annimali u ta' l-in *vitro* jistgħu jkunu estrapolati direttament lill-bniedem iridu jiġu kkunsidrati u għalhekk, l-evidenza ta' effetti avversi fil-bnedmin, fejn huma disponibbli, jistgħu jintużaw għall-konfermazzjoni tar-riżultati ta' l-ittestjar.

E. **REFERENZI TA' LETTERATURA**

Bosta minn dawn il-metodi huma żviluppati fi ħdan l-istruttura tal-programm OECD *Testing Guidelines*, u għandhom isiru skond il-prinċipji tal-*Good Laboratory Practice*, sabiex jiżguraw 'l-aċċettazzjoni reċiproka tad-data' kemm jista' jkun.

Informazzjoni addizzjonali tinsab fir-referenzi msemmija fil-linji gwida ta' l-OECD u l-etteratura relevanti ppubblikata x'imkien ieħor.

▼B

B.1 BIS. **TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA – PROĊEDURA GĦAL DOŻA FISSA**

1. **METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalenti għal OECD TG 420 (2001)

1.1. DAĦLA

Il-metodi tradizzjonali għall-istudju tat-tossiċità akuta bl-użu tal-mewt ta' l-annimali bħala l-għan ewlieni. Fil-1984, resqien ġdid dwar it-testijiet tat-tossiċità akuta kien ġie suġġerit mill-British Toxocology Society li huwa ibbażat fuq l-amministrazzjoni f'serje ta' livelli ta' doži fissi (1). Ir-resqien evita l-użu tal-mewt ta' l-annimali bħala l-għan ewlieni, u minflok straħ fuq l-osservazzjonijiet ta' sinjali ċari tat-tossiċità f'wieħed mis-serje ta' livelli ta' doži fissi. Bsegwiment ta' studji *in vivo* tal-validazzjoni fil-UK (2) u f'medda internazzjonali (3), il-proċedura kienet adottata bħala metodu tat-test fil-1992. Sussegwentament, il-propjetajiet statistiċi tal-Proċedura ta' Doża Fissa kienu ġew evalwati bl-użu ta' mudelli matematiċi f'serje ta' studji (4) (5) (6). Flimkien, l-istudji *in vivo* u l-mudellar kienu were li l-proċedura hija riproduċibbli, bl-użu anqas ta' annimali u tikkawża anqas tbagħtija mill-metodi tradizzjonali u hija kapaċi li tiggrada s-sustanzi f'manjera simili mal-metodi l-oħrajn tat-testijiet tat-tossiċità akuta.

Gwida dwar l-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq għal skop partikolari tista' tinstab fid-Dokument ta' Gwida dwar it-Testijiet tat-Tossiċità Akuta Orali (7). Dan id-Dokument ta' Gwida fih ukoll informazzjoni addizzjonali dwar it-twettieq u l-interpretazzjoni tal-Metodu tat-test B.1 bis.

Huwa prinċipju tal-metodu li fl-istudju ewlieni doži tossiċi moderati biss ikunu użati, u li l-amministrazzjoni tad-doži li jkunu mistenna bħala letali għandhom ikunu evitati. Ukoll, id-doži li huma magħrufa bħala li jikkawżaw uġiegħ u tqallib żejjed, minħabba l-azzjonijiet korrossivi jew ta' irritazzjoni qawwija, ma jkunx hemm ħtieġa li jkunu amministrati. Annimali moribondi, jew annimali li ovvjament ikunu bl-uġiegħ jew li juru sinjali ta' tqallib sever u dewwiemi għandhom ikunu maqtula b'mod uman, u huma meqjusa fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bl-istess mezz bħal dawk l-annimali li jkunu mietu waqt it-test. Il-kriterja ta' kif tittieħed id-deċiżjoni sabiex ikunu maqtula l-annimali moribondi jew dawk li jkunu fi tbagħtija kbira, u l-gwida għar-rikonoxximent ta' mewt prevista jew mistennija, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida separat (8).

Il-metodu jipprovdi informazzjoni dwar il-propjetajiet perikoluži u jippermetti li s-sustanza tkun iggradata u ikklassifikata skond il-Globally Harmonised System (GHS) (Sistema Armonizzata Globali) għall-klassifika ta' kimika li toħloq tossiċità akuta (9).

Il-laboratorju tat-test għandu jikkonsidra l-informazzjoni disponibbli kollha dwar is-sustanza tat-test qabel ma jwettaq l-istudju. Tali informazzjoni għandha tinkludi l-identifikaazzjoni u l-istruttura kimika tas-sustanza; il-propjetajiet fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' xi testijiet oħrajn *In vitro* jew *in vivo* dwar is-sustanza' id-dettalji tossikoloġiċi dwar sustanzi struttalment relatati; u l-użu(i) antiċipati tas-sustanza. Din l-informazzjoni hija meħtieġa sabiex tissodisfa lil dawk kollha ikkonċernati li t-test huwa relevanti għall-protezzjoni tas-saħħa umana, u li jkun jgħin fil-għażla ta' doża xierqa għal-bidu.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċita akuta orali: Tirreferi għall-effetti ħżiena li jseħħu wara l-amministrazzjoni orali ta' doża waħda ta' sustanza jew dożi multipli, matul 24 siegħa.

Mewt imdewma: Tfisser li l-annimal ma jkunx u ma jidhirx moribond fi żmien 48 siegħa, imma li jmut aktar tard matul il-perjodu ta' osservazzjoni ta' 14-il jum.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test li tkun somministrata. Id-doża hija espressa bħala l-piż tas-susatanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal tat-test (eż. mg/kg).

Tossiċità evidenti: Hija terminoloġija ġenerali li tiddeskrivi sinjali ċari tat-tossiċita bħala segwiment ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test (ara (3) għall-eżempji) bħal ma hija d-doża fissa segwenti aktar għolja li toħloq uġiegħ waqqi jew sinjali dewwiema ta' tbagħtija qawwija, l-istatus ta' moribond (il-kriterja hija ippreżentatha fil-Humane Endpoints Guidance Document (8) (Dokument ta' Gwida dwar l-Għanijiet Umani)), jew li l-probabbiltà ta' mortalità f'bosta annimali tista' tkun mistennija.

GHS: *Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*. (Sistema tal-Klassifikazzjoni Armonizzata Globali dwar Sustanzi u Taħlitiet Kimiċi.) Attività konġunta tal-OECD (is-saħħa umana u l-ambjent), il-Kumitat tan-NU ta' l-Esperti dwar it-Trasport ta' Oġġetti Perikoluż (il-propjetajiet fiżiċi/-kimiċi) u l-ILO (kommunikazzjoni ta' periklu) u kordinata mill-Programm Interorganizzazzjonali għal Amministrazzjoni Soda tal-Kimika (IOMC).

Mewt iminenti: Meta l-istat ta' moribond jew mewt ikun mistenni qabel il-ħin ta' l-osservazzjoni segwenti ippjanata. Sinjali indikattivi ta' dan l-istat f'annimali gerriema jistgħu jinkludu konvulżjonijiet, posizzjoni laterali, mimduda, u roda. (Ara d-Dokument ta' Gwida dwar l-Umanita Immirata (8) għal aktar dettalji).

LD_{50} (doża letali medja): Hija akkwistata b'mod statistiku minn doża waħda ta' sustanza li tista' tkun mistennija li tikkaġuna mewt f'50 fil-mija ta' l-annimali meta amministrati permezz tar-rotta orali. Il-valur LD_{50} huwa espress f'termini ta' piż tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal tat-test (mg/kg).

Limitu tad-doża: Tirreferi għal doża fil-litu l-aktar għoli tagħha waqt it-testijiet (2 000 jew 5 000 mg/kg).

L-istat moribondi: Huwa l-istat ta' qabel il-mewt jew ta' l-inabbiltà tas-sopravivenza, anki jekk ikun hemm trattament. (Ara d-Dokmunet ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (8) dwar aktar dettalji).

Mewt mistennija: Il-preżenza ta' sinjali kliniċi indikattivi tal-mewt fi żmien mistenni jew inkella fil-ġejjieni imma qabel it-tmiem ippjanat ta' l-esperiment, per eżempju: l-inabbiltà li jersaq lejn l-ilma u lejn l-ikel. (Ara d-Dokmunet ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (8) dwar aktar dettalji).

▼B

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Gruppi ta' annimali ta' sess wieħed huma mogħtija doża fi proċedura mtarrġa bl-użu ta' dożi fissi ta' 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg (eċċezzjonalment għal doża fissa addizzjonali ta' 5 000 mg/kg li tista' tkun ikkonsidrata, ara s-sezzjoni 1.6.2.). Il-livell inizjali tad-doża huwa magħżul fuq il-bażi ta' l-istudju tas-sejbien bħala d-doża mistennija li tipproduċi xi sinjali ta' tassiċità mingħajr ma toħloq l-effetti ta' tossiċità severa jew tal-mortalità. Is-sinjali kliniċi u l- kundizzjonijiet assoċjati ma l-uġiegħ, sofferenza, u mewt iminenti, huma deskritti fid-dettall fi Gwida OECD separata, id-Dokument (8). L-annimali jistgħu jingħataw doża aktar għolja jew aktar baxxa, jiddependi mill-preżenza jew in-nuqqas ta' sinjali ta' tossiċità jew mortalità. Din il-proċedura tinżamm sakemm id-doża li toħloq tossiċità evidenti jew ta' mewt waħda jew aktar, ikunu identifikati, jew meta l-ebda effetti ma jkunu jidhru fid-doża l-aktar għolja jew meta l-imwiet iseħħu fid-doża l-aktar baxxa.

1.4. ID–DESKRIZZJONI TAL–METODU TAT–TEST

1.4.1. **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

L-ispeċi preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċi oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Normalment ikunu wżata il-femminili (7). Dan huwa minħabba li listħarriġ letterarju tat-testijiet konvenzjonali LD_{50} juru li normalment ikun hemm ftit differenza fis-sensittività bejn is-sessi, imma li f'dawk il-każi meta d-differenzi jkunu osservati, in-nisa ikunu ġeneralment kemm xejn aktar sensittivi (10). B'dana kollu, jekk tagħrif dwar il-propjetajiet tossikoloġiċi jew tossikinetiċi ta' kimiċi strutturament relatati jindika li l-irġiel aktarx li jkunu aktar sensittivi, allura dak is-sess għandu jkun użat. Meta t-test ikun imwettaq fuq maskili, ġustifikazzjoni adekwata għandha tkun ipprovduta.

Annimali żgħażagħ adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Kull annimal, fil-bidu ta' meta jkun sejjer jingħata doża, għandu jkun f'età ta' bejn 8 u 12 il-ġimgħa u l-piż tiegħu għandu jkun fil-medda ta' ± 20 % tal-piż medju ta' dawk l-annimali li preċedentament ikun u ntużaw għad-dożi.

1.4.2. **Il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 ºC (± 3 ºC). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-annimali jistgħu ikunu miġbura flimkien bħala grupp skond id-doża, imma n-numru ta' l-annimali f'kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjonijiet ċari ta' kull annimal.

1.4.3. **Preparazzjoni ta' l-annimali**

L-animmali għandhom ikunu magħżula kif jinzerta, immarkati sabiex jippermettu identifikazzjoni individwali, u miżmuma fil-gaġġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 tijiem qabel il-bidu tad-dożi sabiex jippermettu li jkunu akklamattiżati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

▼B

1.4.4. **Preparazzjoni tad-doża**

Ġeneralment, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu amministrati f'volum kostanti matul medda ta' doża tat-testijiet bil-varjazzjoni tal-konċentrazzjoni fil-preparazzjoni tad-doża. Meta, b'dana kollu, likwidu jew taħlita ikunu l-prodott finali, l-użu ta' sustanza tat-test mingħajr trattib, i.e. konċentrazzjoni kostanti, tista' tkun aktar relevanti għall-istudju sussegwenti tar-riskju ta' dik is-sustanza, u hija ħtieġa għal uħud mill-awtoritajiet regolatorji. Fi kwalunkwe każ, il-volum massimu tad-doża għall-amminsitrazzjoni m'għandux ikunu misbuq. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Fl-annimali gerriema, il-volum m'għandux normalment jeċċedi 1ml/100g tal-piż tal-ġisem: b'dana kollu fil-każ ta' taħlitiet akweji, 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jkun ikkonsidrat. Fir- rigward tal-formulazzjoni tal-preparazzjoni tad-doża, l-użu ta' taħlita/-sospenzjoni/emulsifikazzjoni akweja hija rakkommandata kull meta possibbli, segwita f'ordni ta' preferenza bit-taħlita/sospenzjoni/-emulsifikazzjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħ-ir- rum) u mbagħad il-possibbiltà ta' likwidi oħrajn. Għal likwidi oħrajn apparti milli l-ilma, il- karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. Id-doži għandhom ikunu ippreparati ftit qabel l-amministrazzjoni, sakemm l-istabbilità tal-preparazzjoni matul il- perjodu ta' l-użu tkun magħruha u turi li tkun aċċettabbli.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Amministrazzjoni tad-doži**

Is-sustanza tat-tes hija somministrata f'doża waħda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi intubazzjoni canula xierqa. F'ċirkostanzi mhux tas-soltu li fihom doża waħda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix l-24 siegħa.

L-annimali għandhom ikunu msajma qabel ma jingħataw id-doża (eż. għall-firien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul il-lejl sal-ħin ta' l-esperiment; fil-każ ta' ġurdien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul 3-4 siegħat). Wara l-perjodu tas-sawma, l-annimali għandhom ikunu miżuna u s-sustanza tat-test tkun somministrata. Wara li s-sustanza tat-test tkun somministrata, l-ikel jista' jkun imċaħħad għal 3-4 siegħat oħra fil-każ tal-firien jew 1-2 siegħat fil-każ tal-ġrieden. Meta d-doża tkun somministrata fi frazzjonijiet matul perjodu ta' żmien, jista' jkun meħtieġ li l-annimali jkunu ipprovduti b'ikel u ilma, jiddependi mit-tul tal-perjodu.

1.5.2. **Studju ta' l-osservazzjoni**

L-iskop ta' l-istudju ta' l-osservazzjoni huwa li jippermetti l-għażla xierqa tad-doża tal-bidu li tintuża fl-istudju ewlieni. Is-sustanza tat-test hija somministrata lill-annimali singoli b'manjera sekwenzali skond il-karti tan-nixxija fl-Anness 1. L-istudju ta' l-osservazzjoni ikunu komplut meta d-deċiżjoni dwar il-bidu tad-doża għall-istudju ewlieni tkun tista' tittieħed (jew jekk il-mewt tkun apparenti fid-doża l-baxxa kif stabbilita).

Id-doża tal-bidu għall-istudju ta' l-oisservazzjoni hija magħżulha minn livelli fissi ta' doži ta' 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg bħala doża mistennija li tipproduċi tossiċità evidenti ibbażata, meta possibbli, fuq evidenza mid-dettalji *In vivo* u *In vitro* mill-istess kimika jew il-kimiċi ta' struttura relatata. Fin-nuqqas ta' tali informazzjoni, id-doża tal-bidu għandha tkun 3000 mg/kg.

Perijodu ta' mill-anqas 24 siegħa għandu jkun imħolli bejn l-għoti tad-doża lil kull annimal. L-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal mil anqas 14-il jum.

▼B

B'mod eċċezzjonali, u biss meta iġġustifikat bi ħtiġiet regolatorji speċifiċi, l-użu ta' doża addizzjonali iffissata fil-livel għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkonsidrata (ara l-Anness 3). Għal raġunijiet li jikkonċernaw il-ġid ta' l-annimali, it-testijiet ta' l-annimali skond GHS, il-Kategorija 5, il-meded (2 000-5 000 mg/kg huma ferm skorraġiti u għandhom biss ikunu ikkonsidrati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu relevanza diretta għall-rotezzjoni umana jew tas-saħħa ta' l-annimali jew dik ambjentali.

Fil-każi meta annimal ikun ittestjat fil-livell l-aktar baxx ta' doża fissa (5 mg/kg) fl-istudju ta' l-osservazzjoni imut, il-proċeduira normali hija li jkun terminat l-istudju u li s-sustanza tkun assanjata għal-GHS, Kategorija 1 (kif muri fl-Anness 1). B'dana kollu, jekk aktar konferma tal-klassifika tkun meħtieġa, proċedura supplementari voluntarja tista' tkun imwettqa, kif ġej: It-tieni annimal ikunu mogħti d-doża f'5 mg/kg. Jekk dan it-tieni annimal imut, allura il-Kategorija 1 GHS tkun ikkonfermata u l-istudju jkun terminat immedjetament. Jekk it-tieni annimali jibqa ħaj, allura massimu ta' tlett annimali addizjnonali ikunu mogtoja d-doża ta' 5 mg/kg. Minħabba li jkun hemm riskju kbir ta' mortalità, dawn l-annimali għandhom ikunu mogjħtija d-doża b'mod sekwenzali sabiex ikun imħares il-ġid ta' l-annimali. Fl-intervall ta' ħin bejn kull doża għal kull annimal għandu jkun suffiċjenti sabiex ikun stabbilit jekk l-annimal preċedenti jkunx sejjer jibqa ħaj. Jekk isseħħ it-tieni mewt, is-sekwenza tad-doża għandha tkun terminata immedjetament u l-ebda annimali oħrajn ma jingħataw id-doża. Minħabba l-okkorrenza tat-tieni mewt (irrispettivemanet min-numru ta' l-annimali ittestjati fil-waqt tat-terminazzjoni) tidħol fl-eżitu A (2 jew aktar imwiet), ir-regola tal-klassifika ta' l-Anness 2 fi 5 mg/kg doża fissa tkun segwita (il-Kategorija 1 jew ikun hemm 2 jew aktar imwiet, jew il-Kategorija 2 jekk ikun hemm mhux aktar minn mewt waħda). B'żieda, l-Anness 4 jagħti gwida dwar il-klassifika fis-sistema UE sakemm GHS ġdida tkun implementata.

1.5.3. **Studju ewlieni**

1.5.3.1. *Numru ta' l-annimali u l-livelli tad-doża*

L-azzjoni li għandha tittieħed b'segwiment tat-testijiet fid-doża tal-livell tal-bidu hija indikata fil-karti nixxija fl-Anness 2. Waħda mit-tlett azzjonijiet tkun meħtieġa; jew li jieqfu t-testijiet u li tkun assenjata l-klassifikazzjoni tal-klassi tal-periklu xierqa, it-test f'doża ta' livell għola jew test f'doża f'livell aktar baxx. B'dana kollu, għall-protezzjoni ta' l-annimali, livell ta' doża li jikkaġuna l-mewt fl-istudju ta' l-osservazzjoni m'għandhiex tkun użata mill-ġdid fl-istudju ewlieni (ara l-Anness 2). L-esperjenza wriet li r-riżultat probabbli fil-livell tad-doża tal-bidu ikun dak li s-sustanza tista' tkun klassifikata u li l-ebda aktar testijiet ma jkunu meħtieġa.

Total ta' ħames annimali ta' sess wieħes ikun normalment użat għal kull livell ta' doża investigata. Il-ħames annimali għandhom ikunu magħmula minn annimal wieħed mill-istudju ta' l-osservazzjoni li jkun ħa doża fil-livell magħżul flimkien ma erba annimali addizzjonali oħrajn (apparti, ħaġa mhux tas-soltu, jekk il-livell tad-doża użat ma kienx inkluż fl-istudju ta' l-osservazzjoni).

L-intervall tal-ħin bejn id-dożi f'kull wieħed mill-livelli huwa determinat bl-iskoppjar, it-tul, u s-severità, tas-sinjali tossiċi. It-trattament ta' l-annimali fid-doża segwenti għandu jkun imdewwem sakemm wieħed ikun żgur bis-sopravivenza ta' l-annimali li jkunu ireċevew id-doża preċedentament. Perijodu ta' minn 3 sa 4 ijiem bejn id-dożi f'kull livell huma rakkommandabbli, jekk maħtieġ, sabiex jippermetti għall-osservazzjoni tat-tossiċità mdewma. L-intervall tal-ħin jista' jkun aġġustat kif xieraq, eż. fil-każ ta' reazzjoni mhux konklussiva.

▼B

Meta l-użu tad-doża l-aktar għolja ta' 5 000 mg/kg ikun ikkonsidrat, il-proċedura kif elenkata fl-Appendiċi 3 għandha tkun segwita (ara wkoll is-sezzjoni 1.6.2.).

1.5.3.2. *Test tal-limitu*

It-test tal-limitu huwa primarjament użat f'sitwazzjonijiet meta dak li jwettaq l-esperiment ikollu informazzjoni li tindika li l-materjal tat-test ma jkunx tossiku, i.e. li jkollu tossiċita biss aktar mil-limitu regolatorju tad-doża. L-informazzjoni dwar it-tossiċità tal-materjal tat-test tista' tkun akkwistat mit-tagħrif dwar komposti simili li kienu ġew ittestjati jew minn taħlitiet jew prodotti simili li kienu ġew ittestjati, billi tkun meqjusa l-identità u l-persentaġġ tal-komponenti magħrufa li huma ta' sinifikanza tossikoloġika. F'dawk is-sitwazzjonijiet meta ftit jew l-ebda informazzjoni ma tkun disponibbli dwar it-tossiċità tagħha, jew meta l-materjal tat-test ikun mistenni li huwa tossiku, it-test ewlieni għandu jkun imwettaq.

Bl-użu tal-proċedura normali, studju ta' l-osservazzjoni li jibda b'doża ta' 2 000 mg/kg (jew b'mod eċċezzjonali 5 000 mg/kg) segwit b'doża fuq erba' annimali oħrajn f'dan il-livell iservi bħala test tal-limitu għal din il-linja ta' gwida.

1.6. OSSERVAZZJONIJIET

L-annimali osservati individwalment wara l-ewwel doża mill-anqas darba matul l-ewwel 30 minuta, perdodikament matul l-ewwel 24 siegħa, b'attenzjoni speċjali mogħtija matul l-ewwel 4 siegħat, u ta' kull minn hemm il-quddiem, għal total ta' 14-il jum, apparti minn meta jkun meħtieġ li dawn jitneħħew mill-istudju u li jkunu maqtula b'mod umanesk għal raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali jew inkella li jinsabu mejta. B'dana kollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandhux ikun iffissat b'mod rigoruż. Għandu jkun determinat bir-reazzjoni tossika, il-ħin ta' l-iskoppjar u t-tul tal-perjodu ta' l-irkupru, u jista' b'hekk ikun estiż meta ikkonsidrat bħala meħtieġ. Il-ħinijiet ta' meta jidhru jew jisparixxu s-sinjali tat-tossiċità huma importanti, speċjalment jekk ikun hemm tendenza li s-sinjali tossiċi jkunu mdewwma (11). L-osservazzjonijiet kollha huma sistematista'ment irreġistrati, b'dettalji individwali jkunu jinżammu għal kull annimal.

Osservazzjonijiet addizzjonali jkunu meħtieġa jekk l-annimali jkomplu juru sinjali ta' tossiċità. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu xi tibdil fil-ġilda u s-suf, l-għajnejn, fil-membrani mukaneji, u wkoll fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċi u tan-nervituri ċentrali, u l-attività somatomuturali u t-tip ta' l-imġieba. Attenzjoni għandha tkun diretta għall-osservazzjonijiet ta' roda, konvulżjonijiet, rieq, dijarrea, letarġija, irqad u koma. Il-prinċipji u l-kriterja kif aggruppati fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Miri Umanitarji għandhom ikunu ikkonsidrati (8). L-annimali misjuba f'kundizzjoni moribonda u l-annimali li juru sinjali ta' uġieħ qawwi jew li jgħaddu minn sinjali ta' tbgħatija, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju. Meta l-annimali jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji jew jekk jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jkun reġistrat bi preċiżjoni kemm jista' jkun possibbli.

1.6.1. **Piż tal-Ġisem**

Il-piżijiet ta' l-annimali individwali għandhom ikunu determinati kemxejn qabel ma s-sustanza tat-test tkun somministrata u mill-anqas darba fil-ġimgħa wara dan. Tibdiliet fil-piż għandhom ikunu ikkalkolati u rreġistrati. Fit-tmiem tat-test, l-annimali li jibqgħu ħajjin għandhom ikunu miżuna w imbagħas maqtula b'mod umanitarju.

▼B

1.6.2. **Patoloġija**

L-annimali kolha tat-test (inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jkunu mneħħija mill-istudju minħabba raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali) għandhom ikunu suġġetti għal nekropsija ġenerali. It-tibdiliet patoloġiċi ġenerali għandhom ikunu irreġistrati għal kull annimal. Eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi li juri evidenza patoloġika ġenerali fl- annimali li jibqgħu ħajjin għa 24 siegħa jew aktar wara li jkunu rċevew id-doża inizjali għandha wkoll tkun ikkunsidrata minħabba li din tista' tforni informazzjoni utili.

2. **DATA**

Data ta' l-annimal individwali għandha tkun ipprovduta. B'żieda ma dan, id-dettalji kollha għandhom ikunu miġbura f'sommarju, li juru għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali użati, in-numru ta' annimali ji jkollhom sinjali ta' tossiċità, in-numru ta' annimali li jinstabu mejta matul it-test jew li jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin tal-mewt ta' l-annimali individwali, deskrizzjoni u l-korsa tal-ħin ta' l-effetti tossiċi, u r-riversabbiltà ta' dawn, u s-sejbiet tan-nekropsija.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skond kif xieraq:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika, il-purità, u meta relevanti, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi (inkluża l- iżomerizzazzjoni);

— dettalji ta' l-identifikazzjoni, inkluż in-numru CAS.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

— speċi/tipi użati;

— l-istatus mikrobioloġiku ta' l-annimali, meta magħruf;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali (inklużi, meta xieraq, raġornament dwar l-użu ta' maskili minflok femminili);

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc.

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi dettalji dwar l-għamla fiżika tal-materjal amministrat;

— dettalji dwar l-amminstrazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi l-volumi tad-doži u l-ħin ta' meta tkun ingħata id-doża;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma (inklużi t-tip/sorsi tad-dieta, is-sorsi ta' l-ilma);

— ir-raġjonar għall-għażla tad-doża tal-bidu.

▼B

Riżultati:

— tabulazzjoni tad-dettalji tar-reazzjoni u tal-livell tad-doża għal kull animal (i.e. l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi l-effetti tal-mortalità, in-natura, is-severanza u t-tul ta' l-effetti);

— tabulazzjoni tal-piż tal-ġisem u tat-tibdiliet fil-piż tal-ġisem;

— il-pożizzjonijiet ta' l-annimali individwali fil-jum ma meta jirċievi d-doża, u wara dan matul intervalli ta' darba fil-ġimgħa, u il-ħin tal-mewt jew ta' meta jkunu maqtula;

— id-data u l-ħin tal-mewt jekk qabel il-qtil previst;

— il-korsa tal-ħin ta' kif jiskoppjaw is-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kienux riversibbli għal kull animal individwali;

— is-sejbiet tan-nekropsija u s-sejbiet ħistopatoloġiċi għal kull animal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

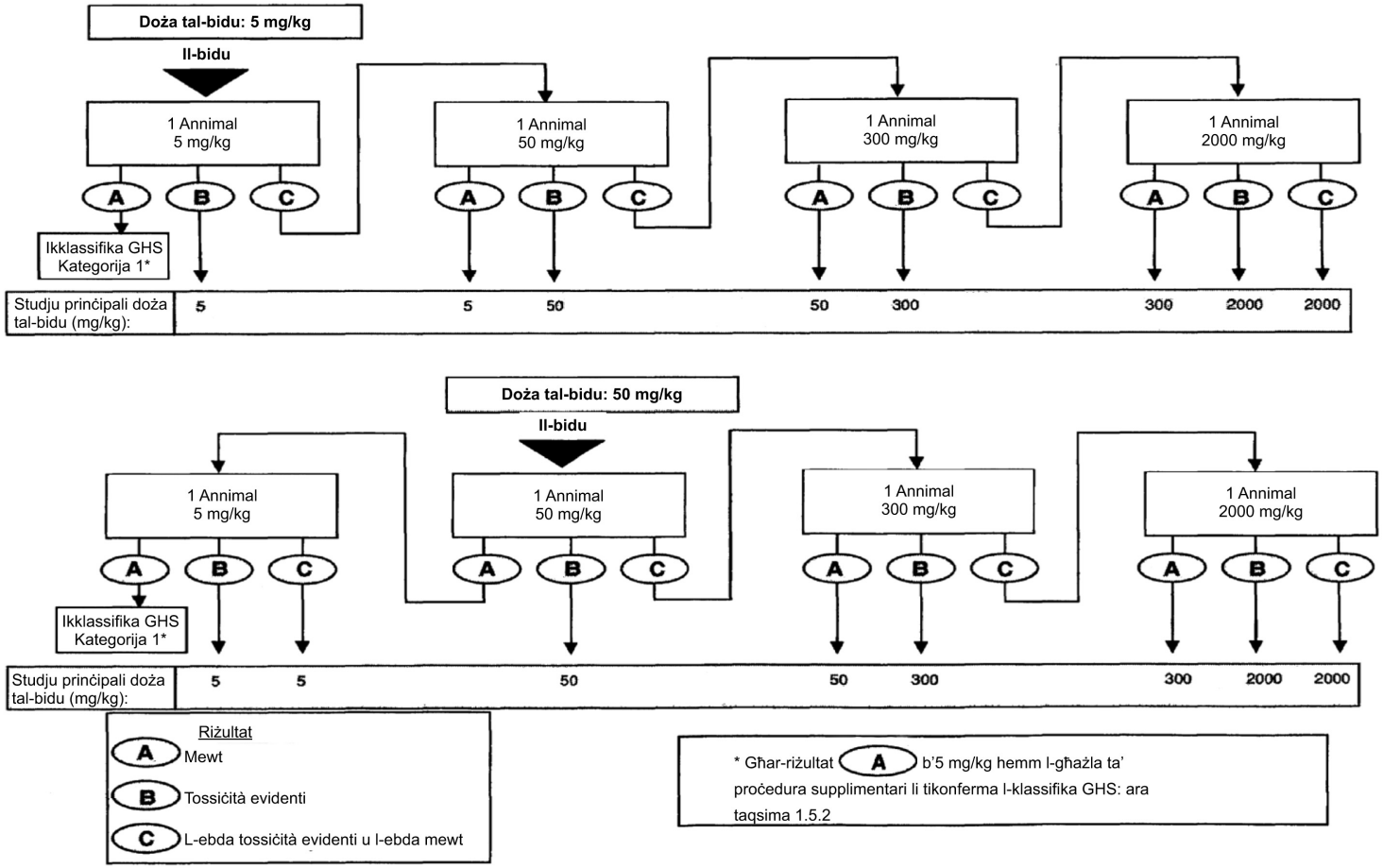
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 ġhttp://webnet1.oecd.org/-oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.htmlħ.

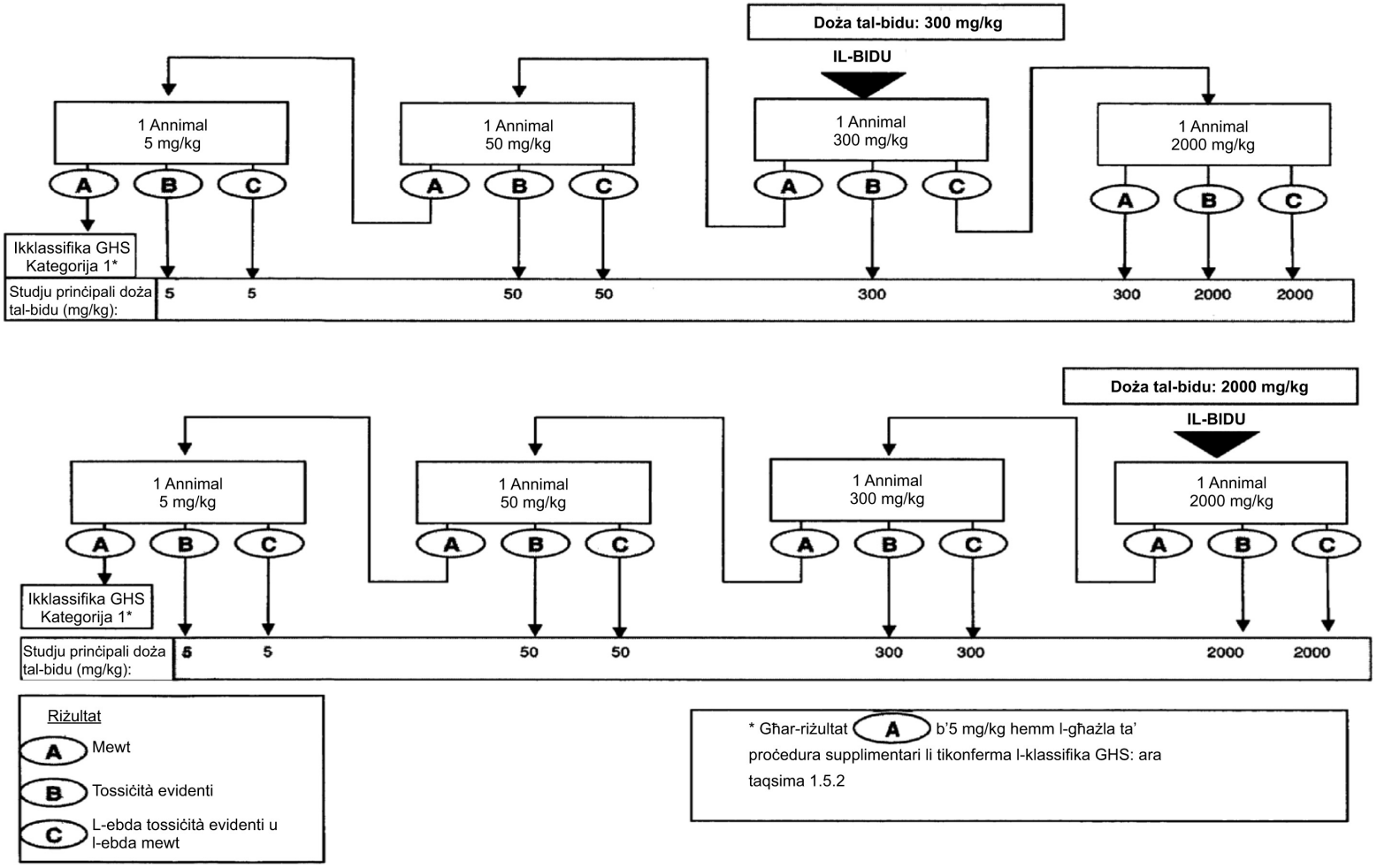
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ANNESS 1

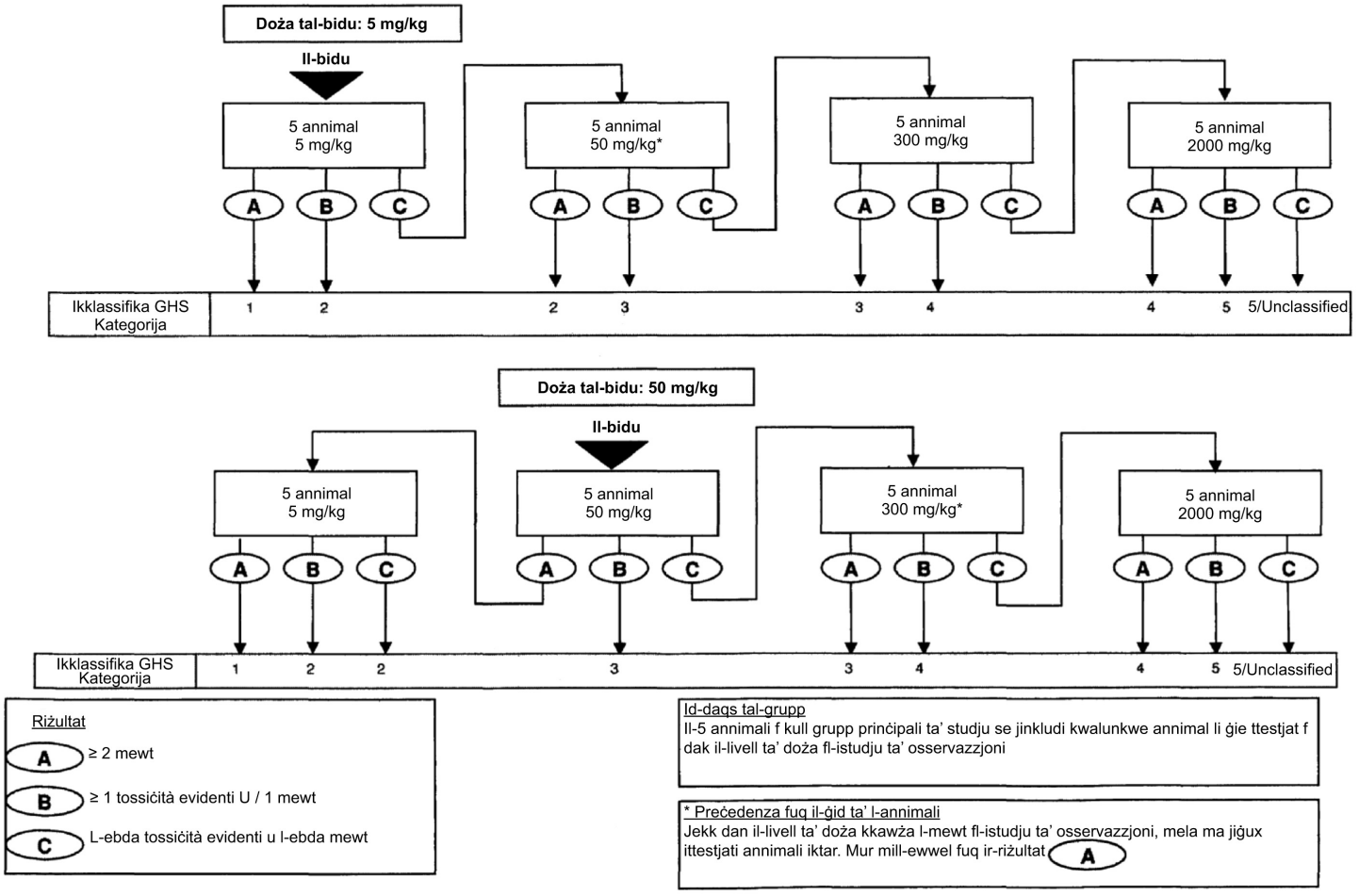
FLOW CHART DWAR L-ISTUDJU TA' OSSERVAZZJONI



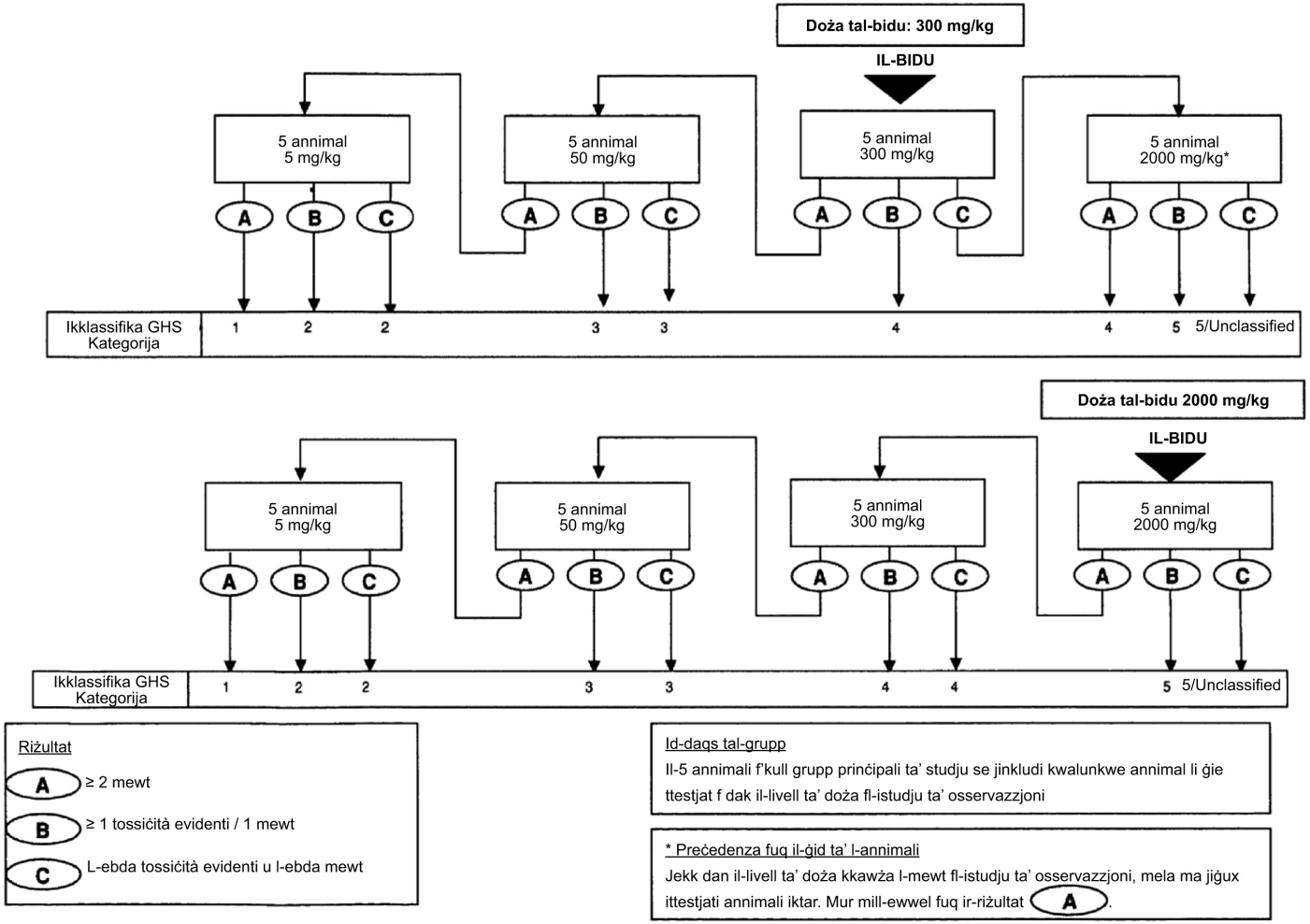

Doża tal-bidu: 300 mg/kg
IL-BIDU
1 Annimal
5 mg/kg
1 Annimal
50 mg/kg
1 Annimal
300 mg/kg
1 Annimal
2000 mg/kg
A
B
C
Ikklassifika GHS
Kategorija 1*
Studju prinċipali doża
tal-bidu (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Doża tal-bidu: 2000 mg/kg
IL-BIDU
1 Annimal
5 mg/kg
1 Annimal
50 mg/kg
1 Annimal
300 mg/kg
1 Annimal
2000 mg/kg
Ikklassifika GHS
Kategorija 1*
Studju prinċipali doża
tal-bidu (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Riżultat
A
Mewt
B
Tossiċità evidenti
C
L-ebda tossiċità evidenti u
l-ebda mewt
* Għar-riżultat A b'5 mg/kg hemm l-għażla ta'
proċedura supplimentari li tikkonferma l-klassifika GHS: ara
taqsima 1.5.2

ANNESS 2:

FLOW CHART DWAR L-ISTUDJU EWLIENI



▼B


Doża tal-bidu: 300 mg/kg
IL-BIDU
5 annimal 5 mg/kg
5 annimal 50 mg/kg
5 annimal 300 mg/kg
5 annimal 2000 mg/kg*
A B C
Ikklassifika GHS Kategorija
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Unclassified
Doża tal-bidu 2000 mg/kg
IL-BIDU
5 annimal 5 mg/kg
5 annimal 50 mg/kg
5 annimal 300 mg/kg
5 annimal 2000 mg/kg
A B C
Ikklassifika GHS Kategorija
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Unclassified
Riżultat
A ≥ 2 mewt
B ≥ 1 tossiċità evidenti / 1 mewt
C L-ebda tossiċità evidenti u l-ebda mewt
Id-daqs tal-grupp
Il-5 annimali f'kull grupp prinċipali ta' studju se jinkludi kwalunkwe annimal li ġie ttestjat f dak il-livell ta' doża fl-istudju ta' osservazzjoni
* Preċedenza fuq il-ġid ta' l-annimali
Jekk dan il-livell ta' doża kkawża l-mewt fl-istudju ta' osservazzjoni, mela ma jiġux ittestjati annimali iktar. Mur mill-ewwel fuq ir-riżultat A.

▼B

ANNESS 3

KRITERJI GĦALL-KLASSIFIKA TAS-SUSTANZI TAT-TEST B'VALURI MISTENNIJA TA' LD_{50} LI JEĊĊEDU 2 000 MG/KG MINGĦAJR IL-ĦTIEĠA TA' TESTIJIET

Il-kriterji dwar il-periklu tal-Kategorija 5 hija ntiża sabiex tiffaċilita l-identifikazzjoni tas-sustanzi tat-test li huma relattivament f'periklu ta' tossiċità akuta baxxa imma li, skond ċerti ċirkustanzi jistgħu jippreżentaw periklu għall-popolazzjonijiet vulnerabbli. dawn is-sustanzi huma antiċipati li jkollhom LD_{50} orali jew tal-ġilda fil-medda ta' 2 000-5 000 mg/kg jew b'doża ekwivalenti għal rotot oħra. Is-sustanzi tat-test jistgħu jkunu kklassifikati fil-kategorija tal-periklu definita bi: 2 000 mg/kg $<LD_{50}<$ 5 000 MG/KG (Kategorija 5 fil-GHS) f'dawn il-każi li ġejjin:

a) jekk ikunu miġjuba f'din il-kategorija minn kwalunkwe skemi tat-testijiet ta' l-Anness 2, ibbażati fuq l-inċidenti tal-mortalità;

b) jekk evidenza affidabbli diġà tkun disponibbli li tindika li l-LD_{50} tkun fil-medda tal-valuri tal-Kategorija 5 jew li studji oħrajn dwar l-annimali jew ta' l-effetti tossiċi fil-bnedmin umani jindikaw tħassib għas-saħħa umana ta' natura akuta;

ċ) permezz ta' estrapolazzjoni, estimi jew kejl tad-dettalji jekk assenjati għal klassi aktar perikoluża milli mistħoqq u

— informazzjoni affidabbli kif disponibbli tindika effetti tossiċi sinifikanti fil-bnedmin, jew

— xi mortalità tkun osservata meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4 bir-rotta orali, jew

— meta ġudizzju minn esperti jikkonferma sinjali kliniċi sinifikanti ta' tossiċità, meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4, apparti milli għal dijarrea, piloerezzjoni jew dehra żmattata, jew

— meta ġudizzju minn esperti jikkonferma li l-informazzjoni affidabli tindika il-potenzjal għal effetti sinifikament akuti minn studji oħrajn fuq l-annimali.

TESTIJIET F'DOŻI OGĦLA MINN 2 000 MG/KG

B'mod eċċezzjonali u biss meta ġġustifikat bi ħtiġiet regolatorji speċifiċi, l-użu ta' doża addizzjonali ffissata fil-livell l-għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkunsidrata. Bir-rikonoxximent tal-ħtieġa li jkun mħares il-ġid ta' l-annimali, testijiet fi 5 000 mg/kg huma skuraġġiti u għandhom biss ikunu kunsidrati meta jkun hemm possibiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu relevanza diretta għall-ħarsien tas-saħħa ta' l-annimali jew dik umana (9).

Studju ta' l-osservazzjoni

Ir-regoli tad-deċiżjoni li jirregolaw il-proċedura sekwenzjali ppreżentata fl-Anness 1 huma estiżi sabiex jinkludu l-livell ta' doża 5 000mg/kg. Għalhekk, meta l-istudju ta' l-osservazzjoni li jibda b'doża ta' 5 000 mg/kg ikun użat, ir-riżultat A (mewt) ikun jeħtieġ it-tieni annimal li jkun ittestjat fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat B u C (tossiċità evidenti jew l-ebda tossiċità) ikunu jippermettu l-għażla ta' 5 000 mg/kg bħala d-doża tal-bidu fl-istudju ewlieni. Bl-istess mod, jekk id-doża tal-bidu apparti milli ta' 5 000 mg/kg tkun użata, allura t-test għandu jipproċedi għal 5 000 mg/kg fil-każ tar-riżultati B jew C fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat A sussegwenti ta' 5 000 mg/kg ikun jimponi studju ewlieni li jibda b'doża ta' 2 000 mg/kg u r-riżultati B u C ikunu jimponu studju ewlieni li jibda b'doża ta' 5 000 mg/kg.

▼B

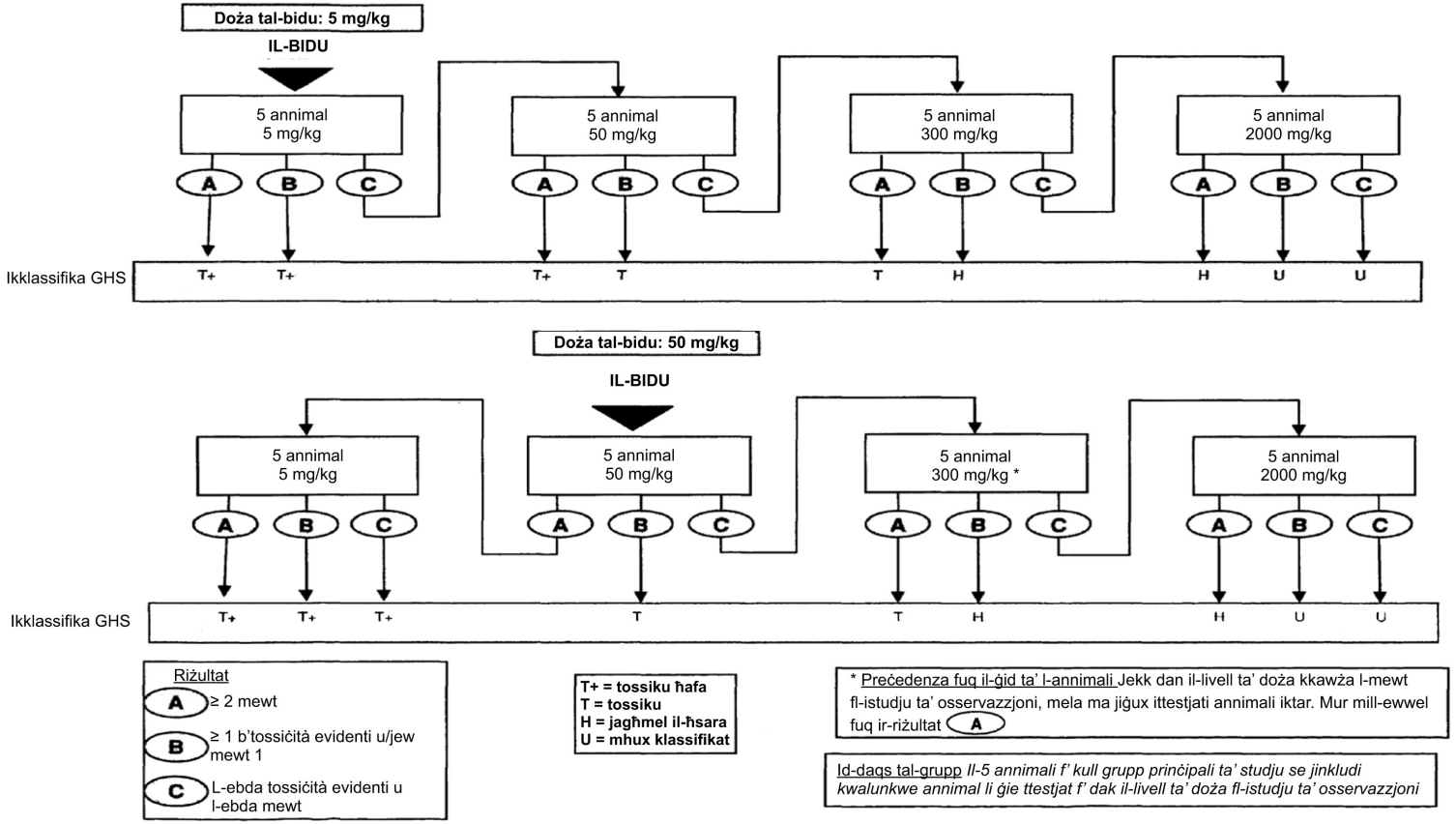
Studju Ewlieni

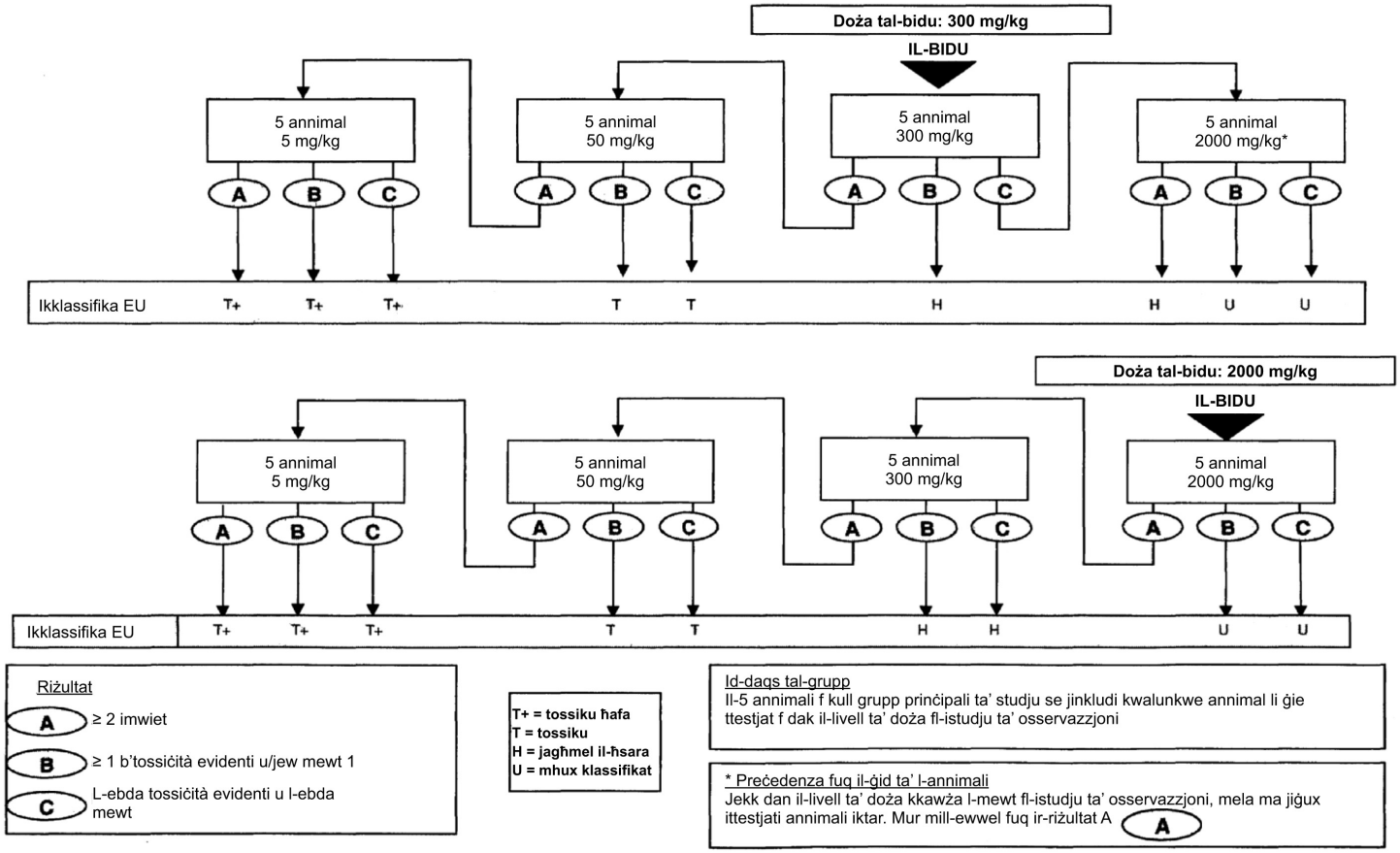
Ir-regoli tad-deċiżjoni li jirregolaw il-proċedura sekwenzjali ppreżentata fl-Anness 2 huma estiżi sabiex jinkludu l-livell ta' doża 5 000 mg/kg. Għalhekk, meta d-doża ta' l-istudju ewlieni li tibda bi 5 000 mg/kg tkun użata, ir-riżultat A (≥ 2 imwiet) ikun jeħtieġ it-testijiet tat-tieni grupp fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat B (tossiċità evidenti u/jew ≤ mewt 1)jew C (l-ebda tossiċità) ikun jirriżulta filli s-sustanza ma tkunx ikklassifikata skond il-GHS. L-istess, jekk id-doża tal-bidu apparti milli ta' 5 000 mg/kg tkun użata, allura t-test ikun jipproċedi lejn il-5 000 mg/kg fil-każ tar-riżultat C fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat A sussegwenti ta' 5 000 mg/kg ikun jirriżulta filli s-sustanza tkun assenjata għal GHS Kategorija 5 u r-riżultati B jew C ikunu jwasslu li s-sustanza ma tkunx ikklassifikata.

ANNESS 4

METODU TAT-TEST B.1.

bis Gwida dwar il-klassifika skond l-iskema UE li tkopri l-perjodu tranżitorju sat-tmiem sħiħ ta' l-implimentazzjoni kollha tas-Sistema Armonizzata tal-Klassifika Globali (GHS) (meħud mir-referenza (8))




Doża tal-bidu: 300 mg/kg
IL-BIDU
5 annimal 5 mg/kg
5 annimal 50 mg/kg
5 annimal 300 mg/kg
5 annimal 2000 mg/kg*
A B C
Ikklassifika EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Doża tal-bidu: 2000 mg/kg
IL-BIDU
5 annimal 5 mg/kg
5 annimal 50 mg/kg
5 annimal 300 mg/kg
5 annimal 2000 mg/kg
A B C
Ikklassifika EU
T+ T+ T+ T T H H U U
Riżultat
A ≥ 2 imwiet
B ≥ 1 b'tossiċità evidenti u/jew mewt 1
C L-ebda tossiċità evidenti u l-ebda mewt
T+ = tossiku ħafa
T = tossiku
H = jagħmel il-ħsara
U = mhux klassifikat
Id-daqs tal-grupp
Il-5 annimali f kull grupp prinċipali ta' studju se jinkludi kwalunkwe annimal li ġie ttestjat f dak il-livell ta' doża fl-istudju ta' osservazzjoni
* Preċedenza fuq il-ġid ta' l-annimali
Jekk dan il-livell ta' doża kkawża l-mewt fl-istudju ta' osservazzjoni, mela ma jiġux ittestjati annimali iktar. Mur mill-ewwel fuq ir-riżultat A

▼B

B.1TRIS. **TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA – METODU TAL-KLASSIFIKA TOSSIKA AKUTA**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalnti għal OECD TG 423 (2001)

1.1. INTRODUZZJONI

Il-metodu tal-klassi tat-tossiċità akuta (1) kif stabbilit f'dan it-test huwa l-proċedura sussegwenti ma l-użu ta' 3 annimali ta' sess wieħed għal kull pass. Jiddependi mill-mortalità u/jew l-istat ta' morbidità li jkunu fih l-annimali, bħala medja 2-3 passi jkunu meħtieġa sabiex jippermeti li jsir ġudizju dwar it-tossiċità akuta tas-sustanza tat-test. Din il-proċedura hija riproduċibbli, tuża ftit annimali u hija kapaċi li tiggrada sustanzi b'manjera simili għall-metodi l-oħrajn tat-testijiet dwar it-tossiċità akuta. Il-metodu tal-klassi tat-tossiċità akuta huwa bbażat fuq evalwazzjonijiet biometriċi (2) (3) (4) (5) b'dożi fissi, separati b'mod adekwat sabiex jippermettu li sustanza tkun iggradata għall-iskopijiet tal-klassifika u ta' l-assessjar tal-periklu. Il-metodu kif adottat fil-1996 kien ġie validat b'mod estensiv *in vivo* bi tqabbil mad-dettalji JD_{50} akkwistati mil-letteratura, kemm nazzjonali (6) u dik internazzjonali (7).

Gwida dwar l-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq għal skop partikolari tista' tinstab fid-Dokument ta' Gwida dwat it-Testijiet tat-Tossiċità Orali Akuta (8). Dan id-Dokument ta' Gwida fih ukoll informazzjoni addizzjonali dwar it-twettieq u l-interpretazzjoni tal-metodu tat-test B. 1 tris.

Is-sustanzi tat-test, fid-dożi li huma magħrufa li jikkaġunaw uġiegħ qawwi u tbatija minħabba l-azzjonijiet korrossivi jew severament irritanti, ma jistgħux ikunu amministrati. Annimali fl-għafja tal-mewt, jew annimali avvjament bl-uġiegħ jew li juru sinjali ta' tbagħtija qawwija għandhom ikun u maqtula b'mod umanitarju, u huma meqjusa fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bl-istess mod bħal dawk l-annimali li jmutu matul it-test. Il-kriterja sabiex tittieħed id-deċiżjoni li jkunu maqtula l-annimali fl-għafja tal-mewt jew dawk li jkunu jbagħtu ħafna, u l-gwida dwar ir-rikonoxximent ta' mewt mistennija jew prevista, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida separat (9).

Dan il-metodu jutilizza dożi definiti bil-quddiem u r-riżultati jippermettu li sustanza tkun gradata u klassifikata skond is-Sistema Globali Armonizzata għall-klassifika ta' kimiċi li jikkaġunaw tossiċità akuta (10).

Bħala prinċipju, il-metodu mhux intiż li jippermetti l-kalkolu ta' LD_{50} preċiża, imma fil-fatt jipperemetti għad-determinazzjoni ta' medded ta' esposizzjoni definita meta l-letalità tkun mistennija minħabba li l-mewt ta' proporzjoni ta' l-annimali tkun xorta waħda l-għan finali ewlieni ta' dan it-test. Il-metodu jippermetti għad-determinazzjoni tal-valur LD_{50} biss meta mill-anqas żewġ dożi jirriżultaw f'mortalità għola minn 0 % u anqas minn 100 %. L-użu ta' għażla ta' dożi definiti bil-quddiem, independentament mis-sustanza tat-test, bil-klassifika espliċitament marbuta man-numri ta' l-annimali osservati f'diversi sitwazzjonijiet ittejjeb l-opportunità għar-rapurtaġġ ta' bejn laboratorju u laboratorju, b'konsistenza u repatabbilità.

▼B

Il-laboratorju tat-test għandu jikkonsidra l-informazzjoni disponibbli kollha dwar is-sustanza tat-test qabel ma jwettaq l-istudju. Tali informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza, il-propjetajiet fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultat ta' xi testijiet oħrajn *In vivo* jew *in vitro* dwar is-sustanza; id-dettalji tossikoloġiċi dwar is-sustanzi strutturament relatati; u l-użu antiċipat tas-sustanza. Din l-informazzjhoni hija meħtieġa sabiex tissodisfa lil dawk kollha ikkonċernati li t-test huwa relevanti għall-protezzjoni tas-saħħa umana u li jkun ta' għajnuna fl-għażla tad-doża tal-bidu l-aktar xierqa.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċità akuta orali: Tirreferi għal dawk l-effetti ħżiena li jseħħu wara l-amministrazzjoni orali ta' doża singola ta' sustanza jew ta' dożi multipli mogħtija matul 24 siegħa.

Mewt imdewma: Tfisser li annimal ma jmutx u ma jkunx jidher f'għafja tal-mewt fi żmien 48 siegħa imma li jmut aktar tard matul il-perjodu ta' l-osservazzjoni ta' 14-il jum.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test kif somministrata. Id-doża hija espressa bħala piż tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal ittestjat (eż. mg/kg).

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures. Is-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata għal Sustanzi u Taħlitiet Kimiċi. Attività konġunta tal-OECD (is-saħħa umana u l-ambjent), Il-Kumitat ta' Esperti tal-NU dwar it-Trasport ta' Oġġetti Perikoluži (il-propjetajiet fiżiċi/kimiċi) u l-ILO (kommunikazzjoni perikoluża) u l-kordinazzjoni mill-Programm Interorganizzazzjonali għal Amministrazzjoni Soda tal-Kimika (IOMC).

Imwiet imminenti: Meta l-istat fl-għafja tal-mewt jew il-mewt ikunu mistennija qabel il-ħin ippjanat segwenti ta' l-osservazzjoni. Sinjali indikattivi għal dan l-istat f'annimali gerriema jistgħu jinkludu konvulżjonijiet, posizzjoni ta' serħan fuq il-ġemb, mitluqa fuq darhom, u tregħid (Ara d-Dokument ta' Gwida ta' l-Għan Finali b'mod Umanitarju (9) għal aktar dettalji).

LD_{50} (doża orali medja ta' l-mwiet): Hija doża akkwistata b'mod statistiku ta' sustanza li tista' tkun mistennija li tikkaġuna l-mewt fi 50 fil-mija ta' l-annimali meta amminsitrata bir-rotta orali. Il-valur LD_{50} huwa espress f'termini ta' piż tas-sustanza tat-test għal kull unità piż ta' l-annimal tat-test (mg/kg).

Doża b'limitu: Tirreferi għad-doża fil-limitu l-aktar għoli tat-testijiet (2 000 jew 5 000 mg/kg).

Stat moribund (fl-għafja tal-mewt): Huwa l-istat li jwassal għall-mewt jew ta' nuqqas ta' kapaċità għal ħajja, anki jekk ittrattat (ara d-Dokument ta' Gwida dwar it-Tmiem Finali b'mod Umanitarju (9) dwar aktar dettalji).

Mewt mistennija: Il-preżenza ta' sinjali kliniċi indikattivi tal-mewt fi żmien mistenni jew inkella fil-ġejjieni imma qabel it-tmiem ippjanat ta' l-esperiment, per eżempju: l-inabbiltà li jersaq lejn l-ilma u lejn l-ikel. (Ara d-Dokmunet ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (9) dwar aktar dettalji).

▼B

1.3. IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Huwa l-prinċipju tat-test li, ibbażat fuq il-proċedura ta' pass b'pass, bl-użu ta' numru minimu ta' annimali kull pass, informazzjoni suffiċjenti tkun akkwista dwar it-tossiċità akuta tas- sustanza tat-test sabiex tiffaċilita l-klassifika tagħha. Is-sustanza hija amministrata b'mod orali fuq grupp ta' annimali esperimentali b'waħda mid-dożi definiti. Is-sustanza hija ittestjata bl-użu tal-proċedura tal-pass b'pass, kull pass jutilizza tlett annimali ta' sess wieħed (normalment nisa). In-nuqqas jew il-preżenza ta' mortalità relatata mal-kompost ta' l-anniamli bid-doża. Ta' l-ewwel pass tkun tiddetermina l-pass segwenti, i.e.:

— l-ebda aktar testijiet ma jkunu meħtieġa,

— id-doża fuq tlett annimali, bl-istess doża,

— id-doża fuq tlett annimali addizzjonali fil-livell aktar għoli segwenti jew fil-livell aktar baxx preċedenti.

Id-dettalji tal-proċedura tat-test huma deskritti fl-Anness I. Il-metodu ikun jiffaċilita ġudizju fir-rigward tal-klassifika ta' sustanza tat-test lejn waħda mis-serje tal-klassijiet ta' tossiċità definiti bil-valuri fissi LD-50 bħala waqfien.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.4.1. **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

L-ispeċi preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċi oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Normalment ikunu wżata il-femminili (9). Dan huwa minħabba li listħarriġ letterarju tat-testijiet konvenzjonali LD-50 juru li normalment ikun hemm ftit differenza fis-sensittività bejn is-sessi, imma li f'dawk il-każi meta d-differenzi jkunu osservati, in-nisa ikunu ġeneralment kemm xejn aktar sensittivi (11). B'dana kollu, jekk tagħrif dwar il-propjetajiet tossikoloġiċi jew tossikinetiċi ta' kimiċi strutturament relatati jindika li l-irġiel aktarx li jkunu aktar sensittivi, allura dak is-sess għandu jkun użat. Meta t-test ikun imwettaq fuq maskili, ġustifikazzjoni adekwata għandha tkun ipprovduta.

Annimali żgħażagħ adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Kull annimal, fil-bidu ta' meta jkun sejjer jingħata doża, għandu jkun f'età ta' bejn 8 u 12 il-ġimgħa u l-piż tiegħu għandu jkun fil-medda ta' ± 20 % tal-piż medju ta' dawk l-annimali li preċedentament ikun u ntużaw għad-dożi.

1.4.2. **Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 ºC (± 3 ºC). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-annimali jistgħu ikunu miġbura flimkien bħala grupp skond id-doża, imma n-numru ta' l-annimali f'kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjonijiet ċari ta' kull annimal.

▼B

1.4.3. **Preparazzjoni ta' l-annimali**

L-annimali għandhom ikunu magħżula kif jinzerta, immarkati sabiex jippermettu identifikazzjoni individwali, u miżmuma fil-gaġġeġ tagħhom għal mil anqas 5 tijiem qabel il-bidu tad-doża sabiex jippermettu li jkunu akklamattiżati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

1.4.4. **Preparazzjoni tad-doża**

Ġeneralment, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu amministrati f'volum kostanti matul medda ta' doża tat-testijiet bil-varjazzjoni tal-konċentrazzjoni fil-preparazzjoni tad-doża. Meta, b'dana kollu, likwidu jew taħlita ikunu l-prodott finali, l-użu ta' sustanza tat-test mingħajr trattib, i.e. konċentrazzjoni kostanti, tista' tkun aktar relevanti għall-istudju sussegwenti tar-riskju ta' dik is-sustanza, u hija ħtieġa għal uħud mill-awtoritajiet regolatorji. Fi kwalunkwe każ, il-volum massimu tad-doża għall-amminsitrazzjoni m'għandux ikunu misbuq. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Fl-annimali gerriema, il-volum m'għandux normalment jeċċedi 1ml/100g tal-piż tal-ġisem: b'dana kollu fil-każ ta' taħlitiet akweji, 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jkun ikkonsidrat. Fir- rigward tal-formulazzjoni tal-preparazzjoni tad-doża, l-użu ta' taħlita/-sospenzjoni/emulsifikazzjoni akweja hija rakkommandata kull meta possibbli, segwita f'ordni ta' preferenza bit-taħlita/sospenzjoni/-emulsifikazzjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħ-ir- rum) u mbagħad il-possibbiltà ta' likwidi oħrajn. Għal likwidi oħrajn apparti milli l-ilma, il- karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. Id-doži għandhom ikunu ppreparati ftit qabel l-amministrazzjoni, sakemm l-istabbiltà tal-preparazzjoni matul il- perjodu ta' l-użu tkun magħrufa u turi li tkun aċċettabbli.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Amministrazzjoni tad-doži**

Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doża waħda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi intubazzjoni canula xierqa. F'ċirkostanzi mhux tas-soltu li fihom doża waħda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix l-24 siegħa.

L-annimali għandhom ikunu msajma qabel ma jingħataw id-doża (eż. għall-firien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul il-lejl sal-ħin ta' l-esperiment; fil-każ ta' ġurdien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul 3-4 siegħat). Wara l-perjodu tas-sawma, l-annimali għandhom ikunu miżuna u s-sustanza tat-test tkun somministrata. Wara li s-sustanza tat-test tkun somministrata, l-ikel jista' jkun imċaħħad għal 3-4 siegħat oħra fil-każ tal-firien jew 1-2 siegħat fil-każ tal-ġrieden. Meta d-doża tkun somministrata fi frazzjonijiet matul perjodu ta' żmien, jista' jkun meħtieġ li l-annimali jkunu ipprovduti b'ikel u ilma, jiddependi mit-tul tal-perjodu.

1.5.2. **Numru ta' l-annimali u l-livelli tad-doži**

Tlett annimali huma użati għal kull pass. Il-livell tad-doża li għandu jkun użat bħala d-doża tal-bidu jkun magħżul minn wieħed minn erba' livelli fissi, 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg piż tal-ġisem. Il-livell tad-doża tal-bidu għandu jkun dak li jkun l-aktar probabbli li jipproduċi mortalità f'uħud mill-animali li jkunu reċevew id-doża. Il-karti tan-nixxija ta' l-Anness 1 jiddeskrivu l-proċedura li għandha tkun segwita għal kull waħda mid-doži tal-bidu. B'żieda, l-Anness 4 jagħti gwida dwar il-klassifika fis-sistema UE sakemm GHS ġdida tkun implementata.

▼B

Meta l-informazzjoni disponibbli tissuġġerixxi li l-lortalità pjuttost li ma sseħħx fl-għola livell tal-bidu (2 000 mg/kg piż tal-ġisem), allura test tal-limitu għandu jkun imwettaq. Meta ma jkunx hemm informazzjoni dwar xi sustanza li għandha tkun ittestjata, għal raġunijiet tal-ġid ta' l-annimali, huwa rakkommandabbli li jsir użu minn doża tal-bidu ta' 300 mg/kg piż tal-ġisem.

L-intervall tal-ħin bejn id-dożi f'kull wieħed mill-livelli huwa determinat bl-iskoppjar, it-tul, u s-severità, tas-sinjali tossiċi. It-trattament ta' l-annimali fid-doża segwenti għandu jkun imdewwem sakemm wieħed ikun żgur bis-sopravivenza ta' l-annimali li jkunu ireċevew id-doża preċedentament.

B'mod eċċezzjonali, u biss meta iġġustifikat bi ħtiġiet regolatorji speċifiċi, l-użu ta' doża addizzjonali iffissata fil-livel għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkonsidrata (ara l-Anness 2). Għal raġunijiet li jikkonċernaw il-ġid ta' l-annimali, it-testijiet ta' l-annimali skond GHS, il-Kategorija 5, il-meded (2 000-5 000 mg/kg huma ferm skorraġiti u għandhom biss ikunu ikkonsidrati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu relevanza diretta għall-rotezzjoni umana jew tas-saħħa ta' l-annimali jew dik ambjentali.

1.5.3. **Test tal-limitu**

It-test tal-limitu huwa primarjament użat f'sitwazzjonijiet meta dak li jwettaq l-esperiment ikollu informazzjoni li tindika li l-materjal tat-test ma jkunx tossiku, i.e. li jkollu tossiċita biss aktar mil-limitu regolatorju tad-doži. L-informazzjoni dwar it-tossiċità tal-materjal tat-test tista' tkun akkwistat mit-tagħrif dwar komposti simili li kienu ġew ittestjati jew minn taħlitiet jew prodotti simili li kienu ġew ittestjati, billi tkun meqjusa l-identità u l-persentaġġ tal-komponenti magħrufa li huma ta' sinifikanza tossikoloġika. F'dawk is-sitwazzjonijiet meta jkun ftit jew l-ebda informazzjoni dwar. It-tossiċità tagħha, jew li fiha l-materjal tat-test ikun mistenni li jirriżulta tossiku, it-test ewlieni għandu jkun imwettaq.

Test tal-limitu f'doża waħda fil-livell ta' 2 000 mg/kg piż tal-ġisem jista' jitwettaq fuq sitt annimali (tlett annimali kull pass). B'mod eċċezzjonali, test tal-limitu b'doża waħda fil-livell ta' 5 000 mg/kg jista' jkun imwettaq fuq tlett annimali (ara l-Anness 2). Jekk il-mortalità tat-test relatata mas-sustanza tirriżulta, aktar testijiet fil-livell preċedenti aktar baxx jista' jkun hemm il-ħtieġa li jitwettqu.

1.6. OSSERVAZZJONIJIET

L-annimali osservati individwalment wara l-ewwel doża mill-anqas darba matul l-ewwel 30 minuta, perjodikament matul l-ewwel 24 siegħa, b'attenzjoni speċjali mogħtija matul l-ewwel 4 siegħat, u ta' kull minn hemm il-quddiem, għal total ta' 14-il jum, apparti minn meta jkun meħtieġ li dawn jitneħħew mill-istudju u li jkunu maqtula b'mod umanesk għal raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali jew inkella li jinsabu mejta. B'dana kollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandhux ikun iffissat b'mod rigoruż. Għandu jkun determinat bir-reazzjoni tossika, il-ħilata' l-iskoppjar u t-tul tal-perjodu ta' l-irkupru, u jista' b'hekk ikun estiż meta ikkonsidrat bħala meħtieġ. Il-ħinijiet li fihom is-sinjali tat-tassiċità) jkunu apparaenti jew li jisparixxu huma. Importanti, speċjalment meta jkun hemm tendenza li s-sinjali tossiċi jkunu mdewma (12). L-osservazzjonijiet kollha huma sistematista'ment irreġistrati, b'dettalji individwali jkunu jinżammu għal kull annimal.

▼B

Osservazzjonijiet addizzjonali jkunu meħtieġa jekk l-annimali jkomplu juru sinjali ta' tossiċità. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu xi tibdil fil-ġilda u s-suf, l-għajnejn, fil-membrani mukaneji, u wkoll fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċi u tan-nervituri ċentrali, u l-attività somatomuturali u t-tip ta' l-imġieba. Attenzjoni għandha tkun diretta għall-osservazzjonijiet ta' roda, konvulżjonijiet, rieq, dijarrea, letarġija, irqad u koma. Il-prinċipji u l-kriterja kif aggruppati fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Miri Umanitarji għandhom ikunu ikkonsidrati (9). L-annimali misjuba f'kundizzjoni moribonda u l-annimali li juru sinjali ta' uġieħ qawwi jew li jgħaddu minn sinjali ta' tbgħatija, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju. Meta l-annimali jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji jew jekk jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jkun reġistrat bi preċiżjoni kemm jista' jkun possibbli.

1.6.1. **Piż tal-ġisem**

Il-piżijiet ta' l-annimali individwali għandhom ikunu determinati kemxejn qabel ma s-sustanza tat-test tkun somministrata u mill-anqas darba fil-ġimgħa wara dan. Tibdiliet fil-piż għandhom ikunu ikkalkolati u rreġistrati. Fit-tmiem tat-test, l-annimali li jibqgħu ħajjin għandhom ikunu miżuna w imbagħas maqtula b'mod umanitarju.

1.6.2. **Patoloġija**

L-annimali kolha tat-test (inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jkunu mneħħija mill-istudju minħabba raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali għandhom ikunu suġġetti għal nekropsija ġenerali. It-tibdiliet patoloġiċi ġenerali għandhom ikunu irreġistrati għal kull annimal. Eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi li juri evidenza patoloġika ġenerali fl-annimali li jibqgħu ħajjin għa 24 siegħa jew aktar wara li jkunu rċevew id-doża inizjali għandha wkoll tkun ikkunsidrata minħabba li din tista' tforni informazzjoni utili.

2. **DATA**

Data ta' l-annimal individwali għandha tkun ipprovduta. B'żieda ma dan, id-dettalji kollha għandhom ikunu miġbura f'sommarju, li juru għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali użati, in-numru ta' annimali ji jkollhom sinjali ta' tossiċità, in-numru ta' annimali li jinstabu mejta matul it-test jew li jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin tal-mewt ta' l-annimali individwali, deskrizzjoni u l-korsa tal-ħin ta' l-effetti tossiċi, u r-riversabbiltà ta' dawn, u s-sejbiet tan-nekropsija.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. **Rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skond kif xieraq:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika, il-purità, u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi (inkluża l- iżomerizzazzjoni);

— dettalji ta' l-identifikazzjoni, inkluż in-numru CAS.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

— speċi/tipi użati;

▼B

— l-istatus mikrobioloġiku ta' l-annimali, meta magħruf;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali (inklużi, meta xieraq, raġornament dwar l-użu ta' maskili minflok femminili);

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc.

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi dettalji dwar l-għamla fiżika tal-materjal amministrat;

— dettalji dwar l-amminstrazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi l-volumi tad-doži u l-ħin ta' meta tkun ingħata d-doża;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma (inklużi t-tip/sorsi tad-dieta, is-sorsi ta' l-ilma);

— ir-raġjonar għall-għażla tad-doża tal-bidu.

Riżultati:

— tabulazzjoni tad-dettalji tar-reazzjoni u tal-livell tad-doża għal kull animal (i.e. l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi l-effetti tal-mortalità, in-natura, is-severanza u t-tul ta' l-effetti);

— tabulazzjoni tal-piż tal-ġisem u tat-tibdiliet fil-piż tal-ġisem;

— il-piżijiet ta' l-annimali individwali fil-jum ma meta jirċievi d-doża, u wara dan matul intervalli ta' darba fil-ġimgħa, u l-ħin tal-mewt jew ta' meta jkunu maqtula;

— id-data u l-ħin tal-mewt jekk qabel il-qtil previst;

— il-korsa tal-ħin ta' kif jiskoppjaw is-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kienux riversibbli għal kull animal individwali;

— is-sejbiet tan-nekropsija u s-sejbiet ħispatoloġiċi għal kull animal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 (http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html).

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

ANNESS 1

PROĊEDURA LI GĦANDHA TKUN SEGWITA GĦAL KULL WAĦDA MID-DOŻI TAL-BIDU

RIMARKI ĠENERALI

Għal kull doża tal-bidu, l-iskemi rispettivi tat-testijiet, kif inklużi f'dan l-Anness, jelenkaw il-proċedura li għandha tkun segwita.

— Anness 1 a: Id-doża tal-bidu hija: 5 mg/kg piż tal-ġisem

— Anness 1 b: Id-doża tal-bidu hija: 50 mg/kg piż tal-ġisem

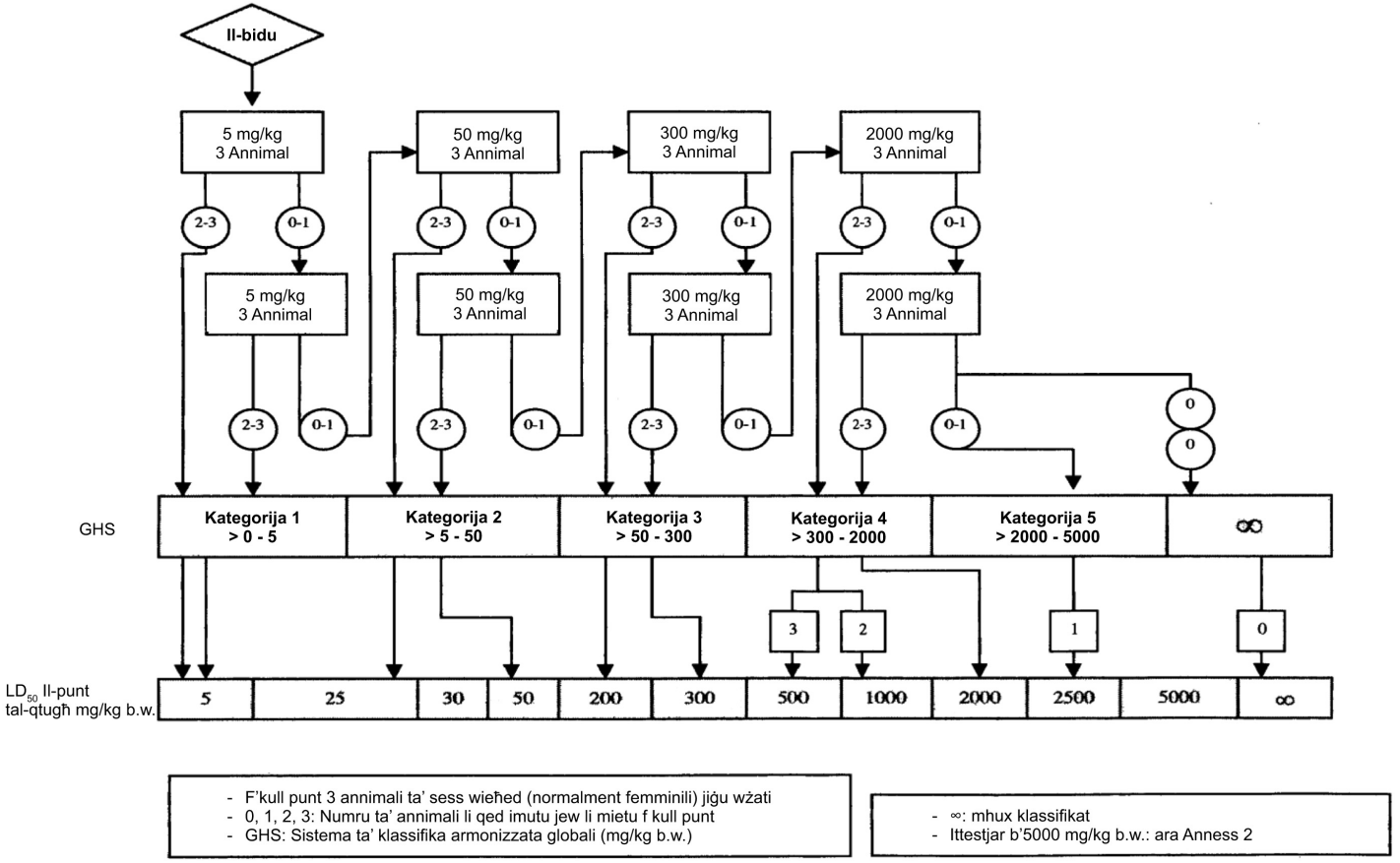
— Anness 1 c: Id-doża tal-bidu hija: 300 mg/kg piż tal-ġisem

— Anness 1 d: Id-doża tal-bidu hija: 2 000 mg/kg piż tal-ġisem

Jiddependi min-numru ta' annimali maqtula b'mod umanitarju jew ta' l-annimali mejta, il-proċedura tat-test għandha ssegwi il-vleġeġ indikati.

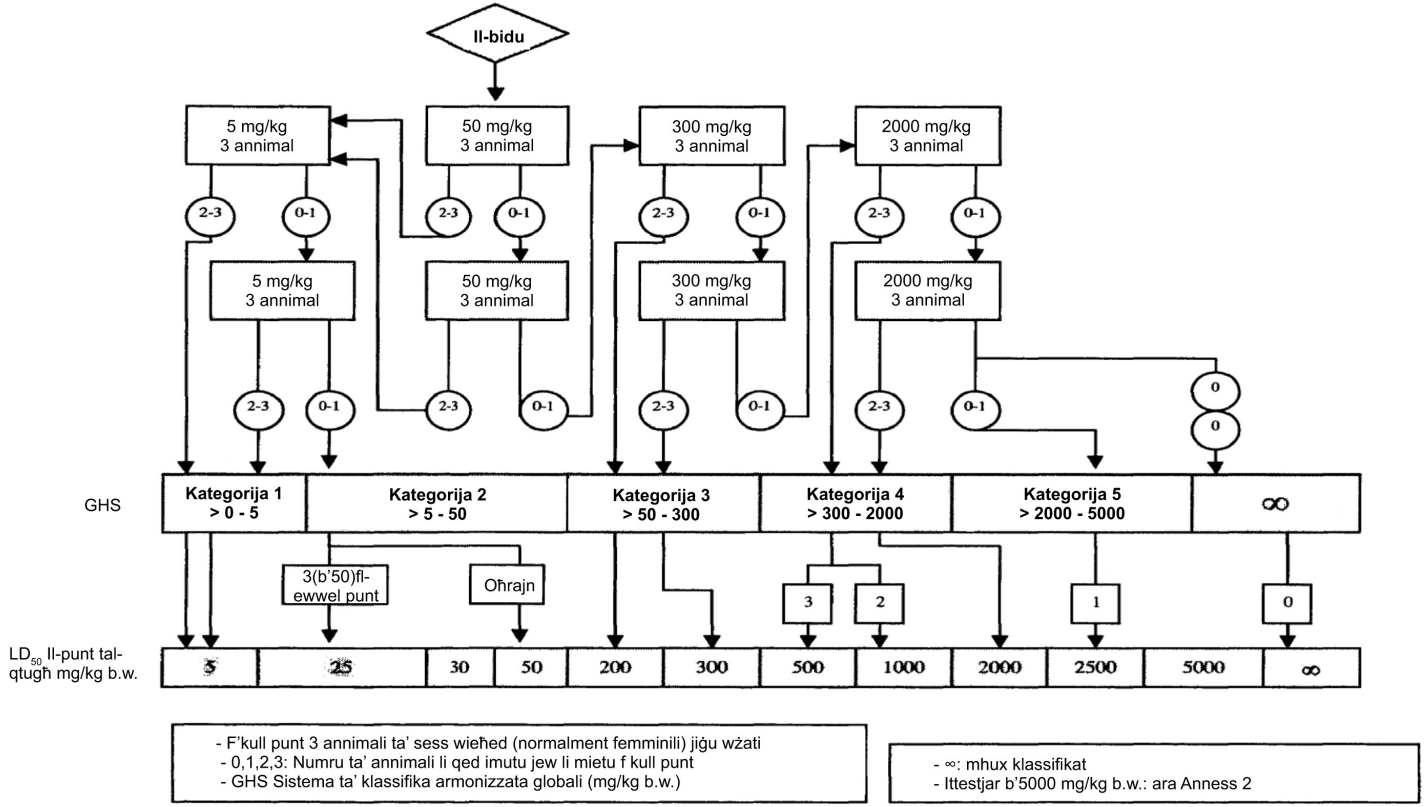
ANNESS 1A

PROĊEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 5 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



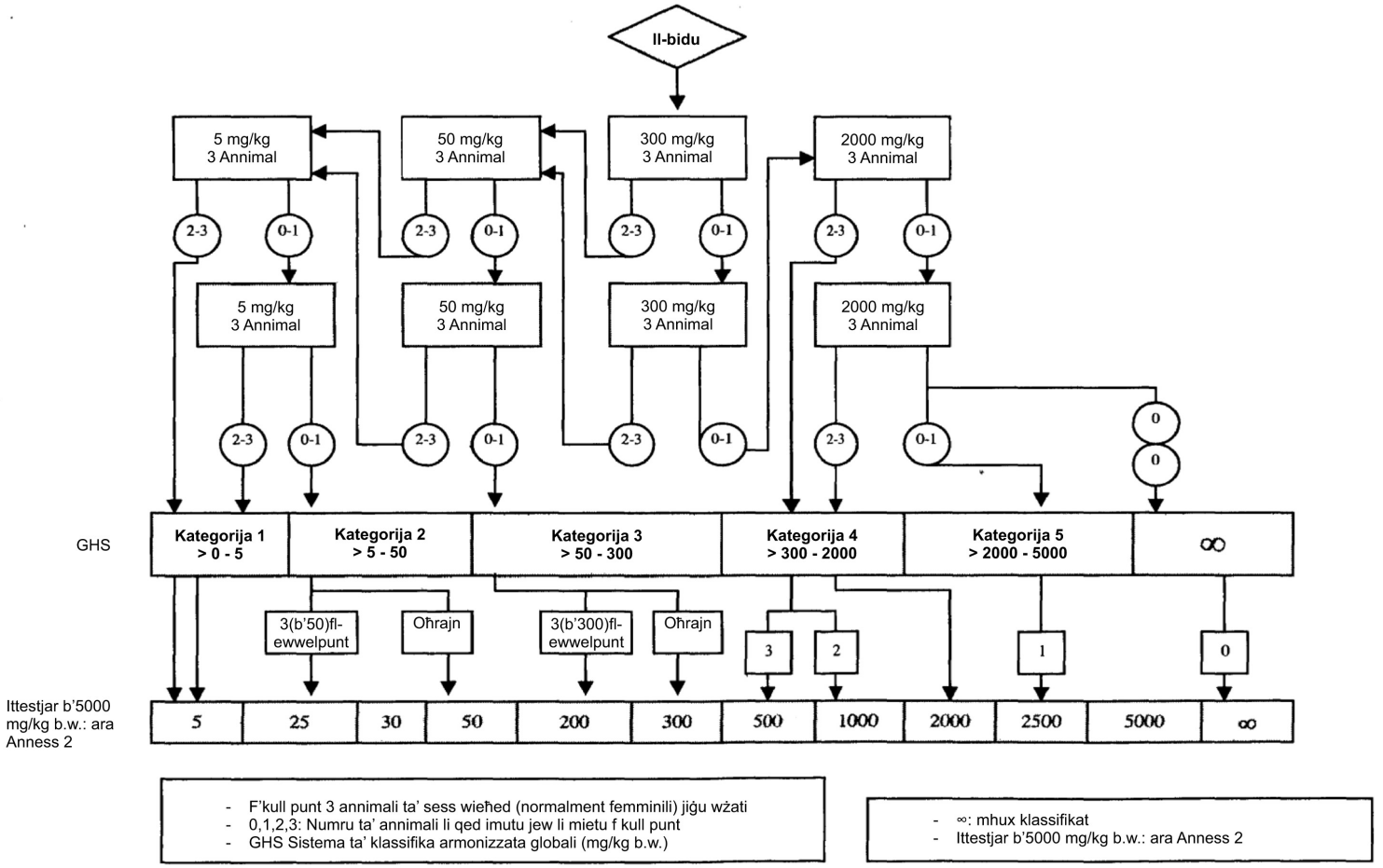
ANNESS 1B

PROĊEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 50 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



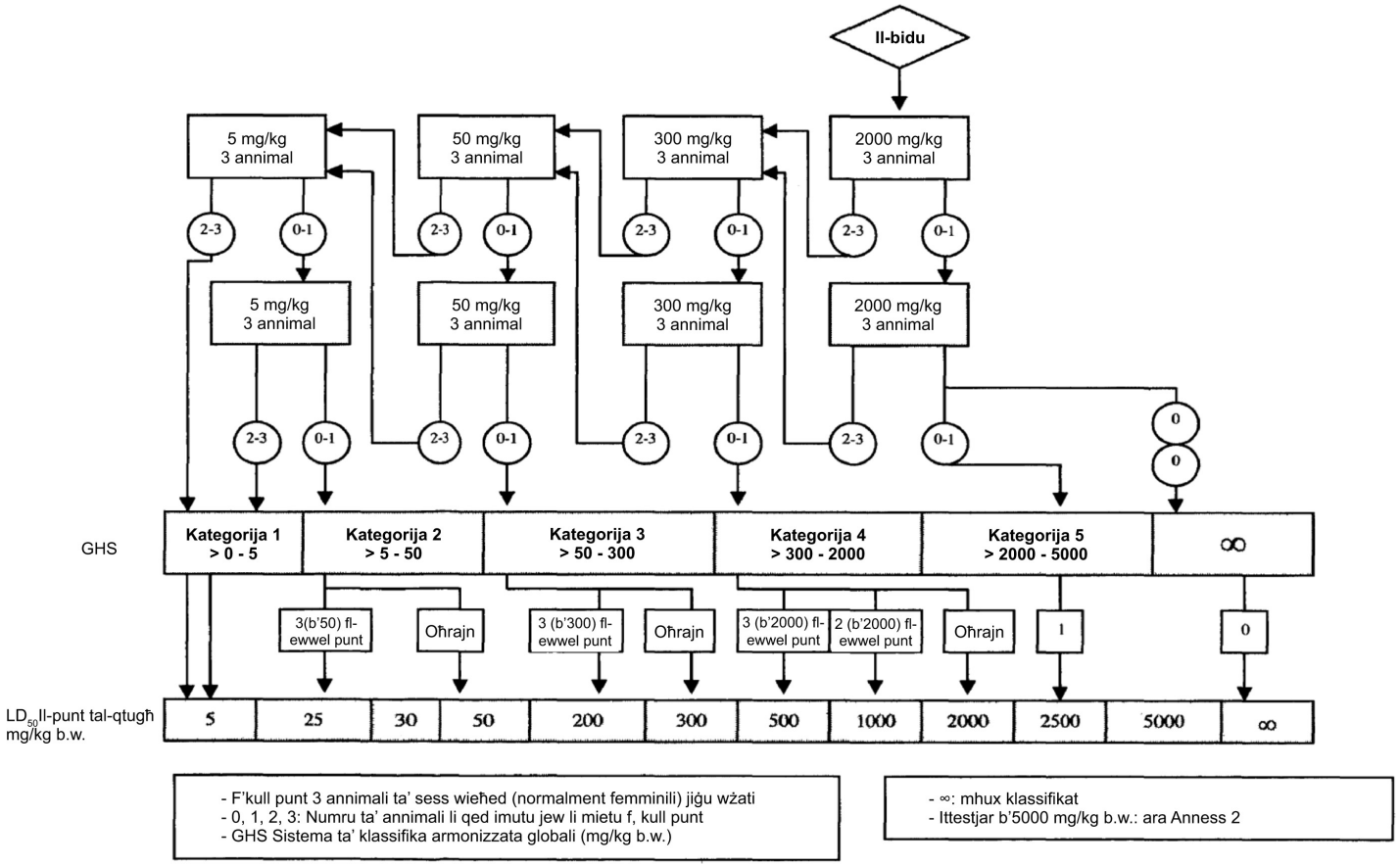
ANNESS 1C

PROĊEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 300 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



ANNESS ID

PROĊEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 2 000 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



▼B

ANNESS 2

KRITERJA GĦALL-KLASSIFIKA TAS-SUSTANZI TAT-TEST B'VALURI MISTENNIJA TA' LD_{50} LI JEĊĊEDU 2 000 MG/KG MINGĦAJR IL-ĦTIEĠA TA'TESTIJIET

Il-kriterji dwar il-periklu tal-Kategorija 5 hija ntiża sabiex tiffaċilita l-identifikazzjoni tas-sustanzi tat-test li huma relattivament f'periklu ta' tossiċità akuta baxxa imma li, skond ċerti ċirkostanzi jistgħu jippreżentaw periklu għall-popolazzjonijiet vulnerabbli. Dawn is-sustanzi huma antiċipati li jkollhom LD_{50} orali jew tal-ġilda fil-medda ta' 2 000 - 5 000 mg/kg jew b'doża ekwivalenti għal rotot oħrajn. Is-sustanzi tat-test jistgħu ikunu klassifikati fil-kategorija tal-periklu definita bi: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (Kategorija 5 fil-GHS) f'dawn il-każi li ġejjin:

a) jekk ikunu miġjuba f'din il-kategorija minn kwalunkwe skemi tat-testijiet ta' l-Anness 2, ibbażati fuq l-inċidenti tal-mortalità;

b) jekk evidenza affidabbli diġà tkun disponibbli li tindika li l-LD_{50} tkun fil-medda tal-valuri tal-Kategorija 5; jew li studji oħrajn dwar l-annimali jew ta' l-effetti tossiċi fil-bnedmin umani jindikaw tħassib għas-saħħa umana ta' natura akuta;

c) permezz ta' extrapolazzjoni, estimi jew kejl tad-dettalji jekk assenjati għal klassi aktar perikoluża milli mistħoqq; u

   — informazzjoni affidabbli kif disponibbli tindika effetti tossiċi sinifikati fil-bnedmin, jew

   — xi mortalità tkun osservata meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4 bir-rotta orali, jew

   — meta ġudizzju minn esperti jikkonferma sinjali kliniċi sinifikanti ta' tossiċità, meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4, apparti milli għal dijarrea, piloerezzjoni jew dehra żmattata, jew

   — meta ġudizzju minn esperti jikkonferma li l-informazzjoni affidabbli tindika l-potenzjal għal effetti sinifikament akuti minn studji oħrajn fuq l-annimali.

TESTIJIET F'DOŻI OGĦLA MINN 2 000 MG/KG

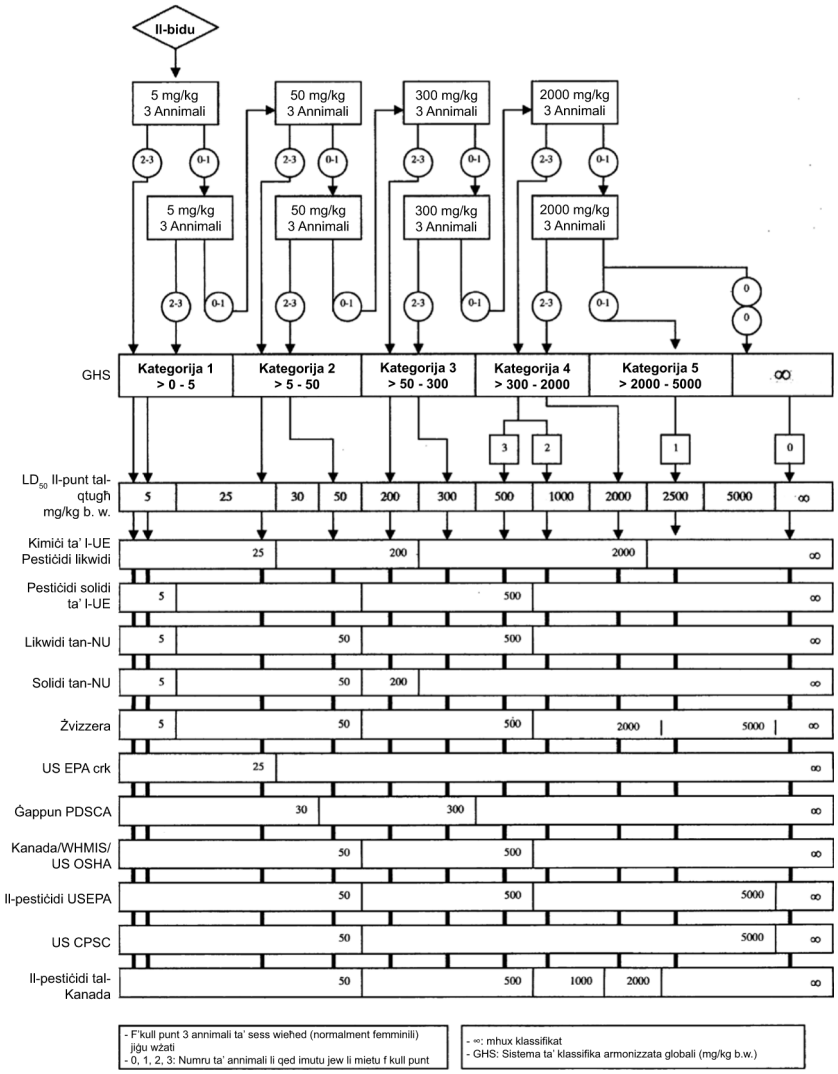
Bir-rikonoxximent tal-ħtieġa li jkun imħares il-ġid ta' l-annimali, testijiet fi 5 000 mg/kg huma skurraġiti u għandhom biss ikunu kkunsidrati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn test bħal dan ikollu relevanza diretta għall protezzjoni tas-saħħa ta' l-annimali jew dik umana (10). L-ebda aktar testijiet m'għandhom ikunu mwettqa fil-livelli tad-doża aktar għoljin.

Meta t-testijiet ikunu jeħtieġu doża ta' 5 000 mg/kg, il-pass wieħed biss (i.e. tliet annimali) huwa meħtieġ. Jekk l-ewwel annimal li jkun ingħata d-doża, imut, allura l-għoti tad-doża għandu jipproċedi fi 2 000 mg/kg skond il-*flow chart* fl-Anness 1. Jekk l-ewwel annimal jibqa' ħaj, żewġ annimali oħrajn għandhom jingħataw id-doża. Jekk wieħed biss mit-tliet annimali jmut, il-valur LD_{50} huwa mistenni li jeċċedi 5 000 mg/kg. Jekk żewġ annimali jmut, allura d-doża tipproċedi fi 2 000 mg/kg.

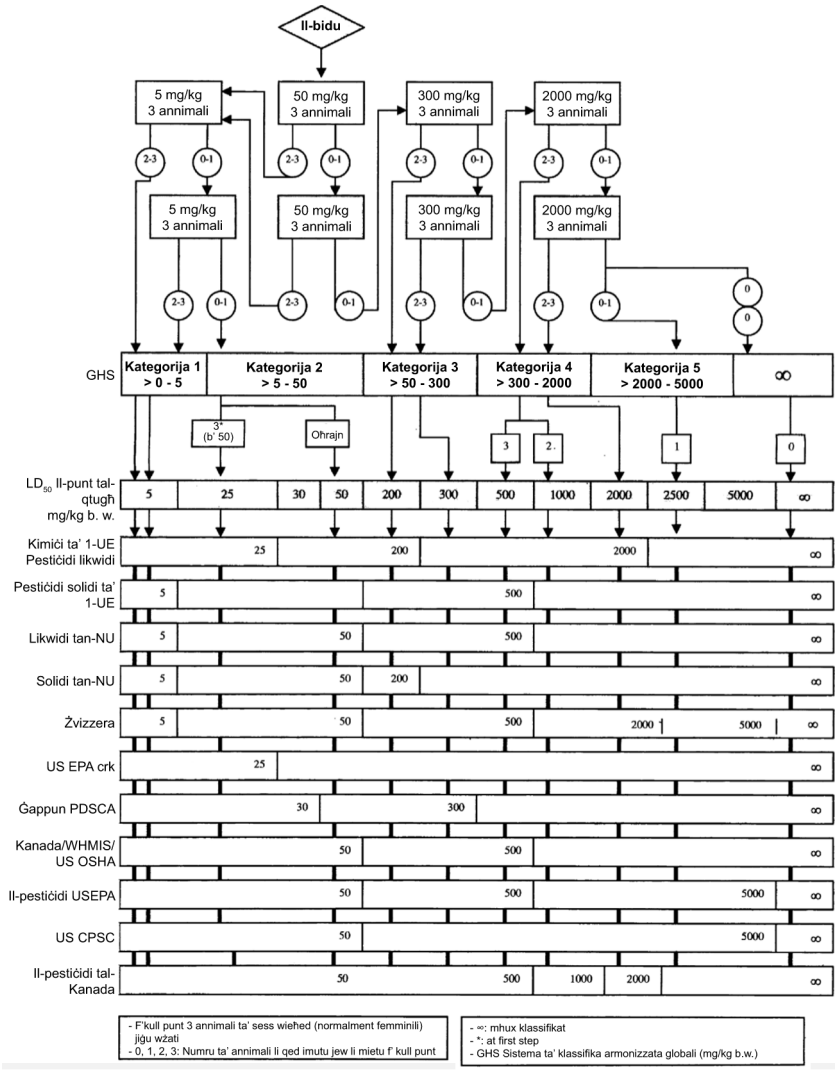
▼B

ANNESS 3

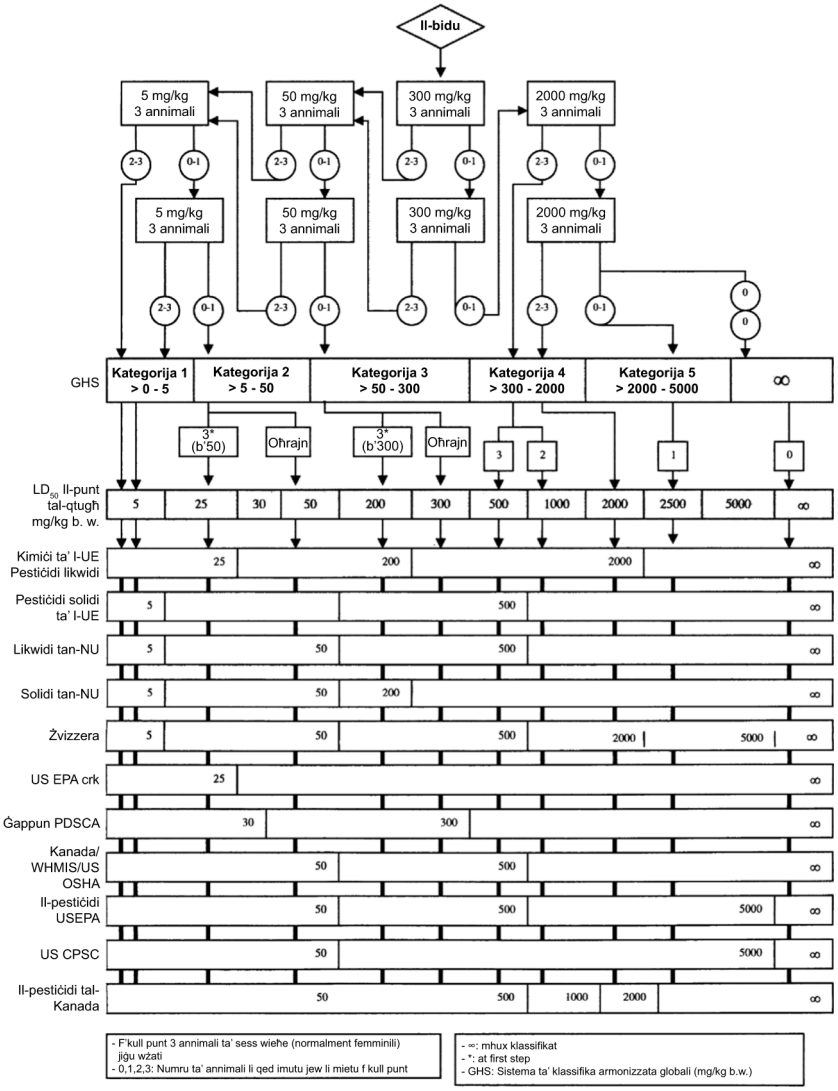
B1c. METODU TAT-TEST Gwida dwar il-klassifika skond l-iskema UE li tkopri l-perjodu transitorju sakemm ikun hemm l-implementazzjoni shiħa tas-Sistema ta' Klassifika Armonizzata Globali (GHS) (meħuda minn referenza (8))



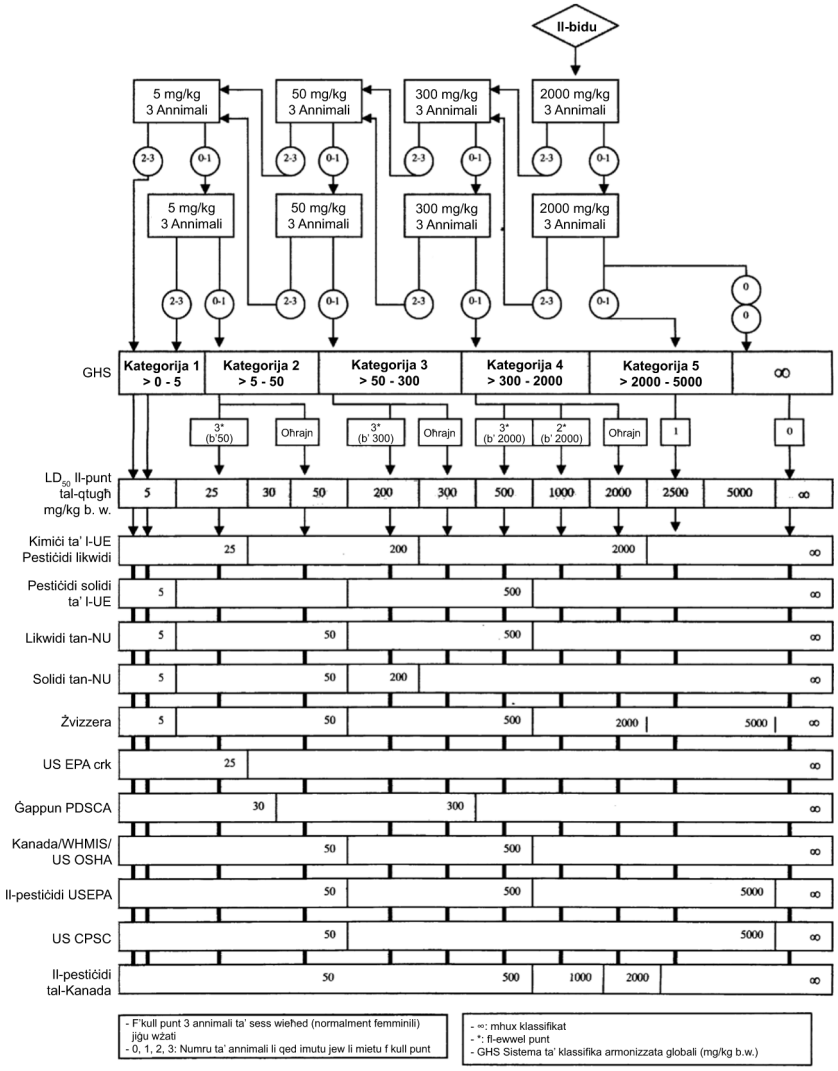
▼B


Il-bidu
5 mg/kg 3 annimali
50 mg/kg 3 annimali
300 mg/kg 3 annimali
2000 mg/kg 3 annimali
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (b' 50)
Ohrajn
3
2
1
0
LD50 Il-punt tal-qtugħ mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
Kimiċi ta' 1-UE Pestiċidi likwidi
Pestiċidi solidi ta' 1-UE
Likwidi tan-NU
Solidi tan-NU
Żvizzera
US EPA crk
Ġappun PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
Il-pestiċidi USEPA
US CPSC
Il-pestiċidi tal-Kanada
- F'kull punt 3 annimali ta' sess wieħed (normalment femminili) jiġu wżati
- 0, 1, 2, 3: Numru ta' annimali li qed imutu jew li mietu f' kull punt
- ∞: mhux klassifikat
- *: at first step
- GHS Sistema ta' klassifika armonizzata globali (mg/kg b.w.)

▼B


Il-bidu
5 mg/kg 3 annimali
50 mg/kg 3 annimali
300 mg/kg 3 annimali
2000 mg/kg 3 annimali
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (b'50)
Ohrajn
3* (b'300)
3
2
1
0
LD50 Il-punt tal-qtugħ mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
Kimiċi ta' l-UE Pestiċidi likwidi
25 200 2000 ∞
Pestiċidi solidi ta' l-UE
5 500 ∞
Likwidi tan-NU
5 50 500 ∞
Solidi tan-NU
5 50 200 ∞
Żvizzera
5 50 500 2000 5000 ∞
US EPA crk
25 ∞
Ġappun PDSCA
30 300 ∞
Kanada/ WHMIS/US OSHA
50 500 ∞
Il-pestiċidi USEPA
50 500 5000 ∞
US CPSC
50 5000 ∞
Il-pestiċidi tal-Kanada
50 500 1000 2000 ∞
- F'kull punt 3 annimali ta' sess wieħe (normalment femminili) jiġu wżati
- 0,1,2,3: Numru ta' annimali li qed imutu jew li mietu f kull punt
- ∞: mhux klassifikat
- *: at first step
- GHS: Sistema ta' klassifika armonizzata globali (mg/kg b.w.)

▼B


Il-bidu
5 mg/kg 3 Annimali
50 mg/kg 3 Annimali
300 mg/kg 3 Annimali
2000 mg/kg 3 Annimali
2-3
0-1
0
GHS
Kategorija 1 > 0 - 5
Kategorija 2 > 5 - 50
Kategorija 3 > 50 - 300
Kategorija 4 > 300 - 2000
Kategorija 5 > 2000 - 5000
∞
3* (b˙50)
Ohrajn
3* (b˙300)
3* (b˙2000)
2* (b˙2000)
1
LD50 Il-punt tal-qtugħ mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
Kimiċi ta' l-UE Pestiċidi likwidi
Pestiċidi solidi ta' l-UE
Likwidi tan-NU
Solidi tan-NU
Żvizzera
US EPA crk
Ġappun PDSCA
Kanada/WHMIS/ US OSHA
Il-pestiċidi USEPA
US CPSC
Il-pestiċidi tal-Kanada
- F'kull punt 3 annimali ta' sess wieħed (normalment femminili) jiġu wżati
- 0, 1, 2, 3: Numru ta' annimali li qed imutu jew li mietu f kull punt
- ∞: mhux klassifikat
- *: fl-ewwel punt
- GHS Sistema ta' klassifika armonizzata globali (mg/kg b.w.)

▼M4

B.2. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test 403 (2009) tal-OECD (1). Il-Linja Gwida 403 (TG 403) tat-Test oriġinali dwar l-inalazzjoni akuta kienet adottata fl-1981. Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.2 rivedut (bħala ekwivalenti għat-TG 403 riveduta) tfassal biex ikun aktar flessibbli, biex inaqqas l-użu tal-annimali, u biex jissodisfa ħtiġijiet regolatorji. Il-Metodu ta' Ttestjar rivedut fih żewġ tipi ta' studji: protokoll Tradizzjonali LC_{50} u protokoll ta' Konċentrazzjoni x Żmien (C × t). Karatteristiċi primarji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma l-kapaċità li jipprovdi relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons b'firxa minn riżultati mhux letali għal dawk letali sabiex jag]ti konċentrazzjoni letali medjana (LC_{50}), livell limitu ta' konċentrazzjoni mhux letali (eż. LC01), u angolu, u biex possibbilment jidentifika suxxettibbiltà sesswali. Il-Protokoll C × t għandu jintuża meta jkun hemm ħtieġa regolatorja jew xjentifika speċifika li ssejjaħ għall-ittestjar ta' annimali tul durati multipli ta' żmien, bħal għall-finijiet ta' ppjanar ta' rispons għal emerġenza [eż. li jidderivaw valuri ta' Linji Gwida ta' Livelli ta' Espożizzjoni Akuta (AEGL), Linji Gwida ta' Ppjanar għal Rispons ta' Emerġenza (ERPG), jew Livelli Limiti ta' Espożizzjoni Akuta (AETL)], jew għal ippjanar ta' użu ta' artijiet.

2. Gwida dwar it-tmexxija u l-interpretazzjoni tal-istudji dwar dan il-Metodu ta' Ttestjar tinsab fid-Dokument ta' Gwida dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta (GD 39) (2).

3. Id-definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u f'GD 39 (2).

4. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jgħin għal karatterizzazzjoni ta' kimiċi u l-valutazzjoni tar-riskju kwantitattiv, u jippermetti li l-kimiċi għall-ittestjar ikunu ggradati u kklassifikati skont ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (3). GD 39 (2) jipprovdi gwida għall-għażla tal-Metodu ta' Ttestjar adattat għal ittestjar akut. Meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar klassifikazzjoni u tikkettar biss, ġeneralment huwa rrakkomandat il-kapitolu B.52 ta' dan l-Anness (4) [ara GD 39 (2)]. Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.2 mhux maħsub speċifikatament għall-ittestjar ta' materjali speċjalizzati, bħal materjali isometriċi jew fibrużi li ftit jinħallu jew nanomaterjali manifatturati.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

5. Qabel ma jitqies l-ittestjar skont dan il-Metodu ta' Ttestjar l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar, inklużi studji eżistenti (eż. il-kapitolu B.52 ta' dan l-Anness (4)) li d-dejta tagħhom tkun tappoġġa li ma jsirx ittestjar addizzjonali, għandhom jitqiesu mil-laboratorji tal-ittestjar biex ikun imminimizzat l-użu tal-annimali. L-informazzjoni li tista' tassisti fl-għażla tal-ispeċi, razza, sess, mod ta' espożizzjoni u konċentrazzjonijiet ta' testijiet l-aktar adatti tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; l-użijiet mistennija u l-potenzjal għal espożizzjoni umana; id-dejta (Q)SAR disponibbli u d-dejta tossikoloġika dwar sustanzi strutturalment relatati [ara GD 39 (2)].

▼M4

6. L-ittestjar ta' kimiċi għall-ittestjar, korrużivi u/jew irritanti f'konċentrazzjonijiet li jkunu mistennija jikkawżaw uġigħ sever u/jew diffikultà għandu jkun evitat kemm jista' jkun possibbli. Il-potenzjal korrusiv/irritanti għandu jiġi evalwat skont ġudizzju espert bl-użu ta' evidenza bħall-esperjenza tal-bniedem jew tal-annimali (eż. minn studji ripetuti ta' dożi li jitwettqu f'konċentrazzjonijiet mhux korrusivi/irritanti), dejta eżistenti *in vitro* (eż. mill-kapitoli B.40, (5), B.40bis (6) ta' dan l-Anness jew OECD TG 435 (7)), il-valuri tal-pH, informazzjoni minn sustanzi simili jew kwalunkwe dejta pertinenti oħra, għall-iskop ta' investifazzjoni dwar jekk jista' ma jsirx iktar ittestjar. Għal ħtiġijiet regolatorji speċifiċi (eż. għal skopijiet ta' ippjanar ta' emerġenza), dan il-Metodu ta' Ttestjar jista' jintuża biex l-annimali jiġu esposti għal dawn il-materjali għaliex jipprovdi d-direttur jew l-investigatur prinċipali tal-istudju li għandu kontroll fuq is-selezzjoni tal-konċentrazzjonijeit fil-mira. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet immirati ma għandhomx jiġġeneraw effetti ta' irritazzjoni/korrużivi severi, iżda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta' konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilħqu l-għan regolatorju u xjentifiku tat-test. Dawn il-konċnetrazzjonijiet għandhom jingħażlu abbażi ta' każ b'każ u għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni għall-għażla tal-konċentrazzjoni [see GD 39 (2)].

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.2 rivedut tfassal biex tinkiseb informazzjoni suffiċjenti dwar it-tossiċità akuta ta' kimika għall-ittestjar biex tkun tista' tiġi kklassifikata u biex jipprovdi dejta dwar il-letalità (eż. $LC_{50,}$ LC_{01} u l-angolu) għal wieħed jew għaż-żewġ sessi kif meħtieġ għall-valutazzjonijiet tar-riskji kwantitattivi. Dan il-Metodu ta' Ttestjar joffri żewġ metodi. L-ewwel metodu huwa protokoll tradizzjonali li fih gruppi ta' annimali jiġu esposti għal konċentrazzjoni limitata (test ta' limitu) jew għal serje ta' konċentrazzjonijiet fi proċedura pass pass għal durata predeterminata normalment 4 sigħat. Jistgħu japplikaw durati oħra ta' espożizzjoni biex jaqdu skopijiet regolatorji speċifiċi. It-tieni metodu (C × t) huwa protokoll li fih gruppi ta' annimali jkunu esposti għal waħda (konċentrazzjoni limitata) jew għal serje ta' konċentrazzjonijiet multipli matul durati multipli.

8. L-annimali moribondi jew annimali li ċarament huma muġugħa jew li jkunu qed juru sinjali ta' diffikultà severa jew fit-tul għandhom jinqatlu b'mod uman u jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultat tat-test bl-istess mod bħall-annimali li jkunu mietu waqt it-test. Il-kriterji għal teħid tad-deċiżjoni li annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu ħafna jinqatlu, u gwida dwar ir-rikonoxximent ta' mewta prevedibbli jew imminenti, huma s-suġġett ta' Document ta' Gwida Nru 19 tal-OECD dwar il-Punti tat-Tmiem b'Mod Uman (8).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċijiet tal-annimali

9. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li normalment jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi preferuta hija l-far u għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw speċijiet oħra.

Preparazzjoni tal-annimali

10. In-nisa għandhom ikunu qatt ma welldu u m'għandhomx ikunu tqal. Fil-jum ta' espożizzjoni, l-annimali għandhom ikunu adulti żgħażagħ ta' bejn 8 u 12-il ġimgħa, u li jkunu jiżnu madwar ± 20 % tal-piż medju għal kull sess ta' kwalunkwe annimal preċedentament qabel tal-istess età. L-annimali jintgħazlu b'mod każwali u jkunu mmarkati għal identifikazzjoni individwalment. L-annimali jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 ijiem qabel ma jibda t-test biex jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. L-annimali għandhom ikunu draw ukoll l-apparat tat-test għal perjodu qasir qabel l-ittestjar, minħabba li dan inaqqas it-tensjoni kkawżata bl-introduzzjoni għall-ambjent il-ġdid.

▼M4

Trobbija tal-annimali

11. It-temperatura tal-kamra ta' manutenzjoni tal-annimali esperimentali għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara l-espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-għadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull annimal u għandu jimminimizza t-telf minħabba l-kannibaliżmu u l-ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieħer biss, jista' jkun jeħtiġilhom jidraw it-tubi ta' trażżin. It-tubi ta' trażżin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusklu. Jekk tkun disponibbli dejta ġenerika li turi li l-ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa kwalunkwe limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx meħtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trażżin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jitħallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' sħabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, ħlief matul l-espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

Kmamar tal-inalazzjoni

12. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-għan tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-mod preferut ta' espożizzjoni huwa mill-imnieħer biss (liema fraži tinkludi r-ras biss, l-imnieħer biss jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieħer biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu aħjar billi tintuża modalità ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu, iżda dan għandu jkun iġġustifikat fir-rapport tal-istudju. Biex tkun żgurata stabbiltà tal-atmosfera meta tintuża kamra għall-ġisem kollu, il-volum totali tal-annimali tat-test m'għandux ikun aktar minn 5 % tal-volum tal-kamra. Il-prinċipji tat-tekniki tal-espożizzjoni mill-imnieħer biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma deskritti f'GD 39 (2).

KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Amministrazzjoni ta' konċentrazzjonijiet

13. L-espożizzjonijiet mill-imnieħer biss jistgħu jkunu ta' kwalunkwe durata sa 6 sigħat għall-firien. Jekk il-ġrieden ikunu esposti mill-imnieħer biss, l-espożizzjonijiet ġeneralment m'għandhomx ikunu itwal minn 4 sigħat. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk ikunu meħtieġa studji li jdumu aktar [ara GD 39 (2)]. L-annimali esposti għall-aerosols fi kmamar għall-ġisem kollu għandhom jingħalqu individwalment biex ma jitħallewx jibilgħu kimika għall-ittestjar minħabba t-tindif ta' sħabhom fil-gaġġa. M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzzjoni. Jista' jingħata ilma matul l-espożizzjoni kollha mill-ġisem kollu.

14. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew taħlita tagħhom. L-istat fiżiku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fiżika li x'aktarx tkun preżenti matul l-immaniġġar u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet li jistgħu jisplodu.

▼M4

Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli

15. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex jitħalla jkun hemm espożizzjoni tar-reġjuni kollha rilevanti tas-sistema respiratorja, huma rrakkomandati aerosols b'dijametri ajrudinamiċi ta' medja massa (MMAD) f'firxa minn 1 sa 4 μm b'devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g) fil-firxa ta' 1,5 sa 3,0 (2) (9) (10). Għalkemm għandu jsir sforz raġonevoli biex dan l-istandard jintlaħaq, għandu jingħata ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, id-dħaħen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u l-partiċelli, fibri u materjali igroskopiċi mimlijin (li jikbru fid-daqs fl-ambjent niedi tas-sistema respiratorja) jistgħu jaqbżu dan l-istandard.

Preparazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'vejjikolu

16. Jista' jintuża vejjikolu biex jiġġenera konċentrazzjoni u daqs ta' partiċelli xierqa tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera. Bħala regola, l-ilma għandu jingħata preferenza. Il-materjal tal-partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex tinkiseb id-distribuzzjoni tad-daqs meħtieġ ta' partiċelli, iżda, għandha tingħata attenzjoni biex il-kimika għall-ittestjar ma tiddekomponix jew tinbidel. F'każijiet fejn proċessi mekkaniċi jitqiesu li jkunu bidlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar (eż. temperaturi estremi minn tħin eċċessiv minħabba l-frizzjoni), il-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun ivverifikata b'mod analitiku. Għandha tingħata attenzjoni adegwata biex il-kimika għall-ittestjar ma tkunx ikkontaminata. Mhux meħtieġ li jkunu ttestjati materjali granulari li ma jiżżartux li jkunu fformulati apposta biex ma jkunux jistgħu jittieħdu man-nifs. Għandu jintuża test ta' attrizzjoni biex jintwera li partiċelli li jistgħu jittieħdu man-nifs ma jkunux prodotti meta jintmiss il-materjal granulari. Jekk test ta' attrizzjoni jipproduċi sustanzi li jistgħu jittieħdu man-nifs, għandu jsir test għat-tossiċità tal-inalazzjoni.

Annimali ta' kontroll

17. Mhux meħtieġ grupp ta' kontroll konkurrenti negattiv (arja). Meta vejjikolu, minbarra l-ilma, jintuża biex jassisti fil-ġenerazzjoni tal-atmosfera tat-test, grupp ta' kontroll ta' vejjikoli għandu jintuża biss meta ma tkunx disponibbli dejta storika ta' teħid ta' tossiċità man-nifs. Jekk studju dwar it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma juri ebda tossiċità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata; għalhekk ma jkunx meħtieġ kontroll ta' vejjikolu.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Fluss tal-arja fil-kamra

18. Il-fluss tal-arja mal-kamra għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u rreġistrat mill-anqas kull siegħa matul kull espożizzjoni. Il-monitoraġġ ta' konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdi mezz indirett għall-kontroll tal-parametri dinamiċi rilevanti kollha tal-ġenerazzjoni tal-atmosfera. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex tkun evitata inalazzjoni mill-ġdid fi kmamar għall-imnieħer biss f'każijiet fejn fluss tal-arja mis-sistema ta' espożizzjoni ma jkunx adegwat biex jipprovdi fluss dinamiku ta' atmosfera tal-kimika għall-ittestjar. Hemm metodoloġiji preskritti li jistgħu jintużaw biex jintwera li inalazzjoni mill-ġdid ma ssirx skont il-kundizzjonijiet operattivi magħżula (2) (11). Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u l-konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wieħed jemmen li dawn l-istandards ma jkunux jistgħu jintlaħqu, il-konċentrazzjonijiet tal-ossiġnu u tad-dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu.

▼M4

Temperatura tal-kamra u umdità relattiva

19. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm għal 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieħer biss kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata u rreġistrata mill-anqas tliet darbiet għal durati sa 4 sigħat, u kull siegħa għal durati iqsar. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati taħlitiet ibbażati fl-ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minħabba interferenza minn kimika għall-ittestjar mal-metodu tal-ittestjar.

Kimika għall-ittestjar: Konċentrazzjoni nominali

20. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominal tal-kamra ta' espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda paragun tal-konċentrazzjoni nominali u l-konċentrazzjoni attwali jagħti indikazzjoni tal-effiċjenza tal-ġenerazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, jista' jintuża biex jiżvela problemi ta' ġenerazzjoni.

Kimika għall-ittestjar: Konċentrazzjoni attwali

21. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu b'metodi speċifiċi (eż. teħid dirett ta' kampjuni, metodi ta' assorbiment jew kimiċi reattivi u karatterizzazzjoni analitika sussegwenti) jew b'metodi mhux speċifiċi bħal analiżi gravimetrika b'filtru. L-użu ta' analiżi gravimetrika huwa aċċettabbli biss għal aerosols tat-trab b'komponent wieħed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilità baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għal kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'ħafna komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analiżi gravimetrika. Iżda din teħtieġ dejta analitika li turi li l-kompożizzjoni tal-materjal fl-arja tkun simili għall-materjal tal-bidu. Jekk din l-informazzjoni ma tkunx disponibbli, tista' tkun meħtieġa analiżi mill-ġdid tal-kimika għall-ittestjar (idealment fl-istat tagħha fl-arja) f'intervalli regolari waqt li jkun għaddej l-istudju. Għal aġenti tal-aerosols li jistgħu jevaporaw jew jissubblimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha nġabru bil-metodu magħżul. Il-konċentrazzjonijiet immirati, nominali u attwali għandhom ikunu pprovduti fir-rapport tal-istudju, iżda fl-analiżi jintużaw biss konċentrazzjonijiet attwali ta' statistika biex ikunu kkalkulati l-valuri ta' konċentrazzjonijiet letali.

22. Għandu jintuża lott wieħed tal-kimika għall-ittestjar, jekk ikun possibbli, u l-kampjun tat-test għandu jinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-purezza, l-omoġeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbeda l-istudju, għandu jkun hemm karatterizzazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkluża l-purezza tagħha, u jekk teknikament fattibbli, l-identità u l-kwantitajiet ta' kontaminanti u impuritajiet identifikati. Dan jista' jintwera bid-dejta li ġejja, iżda ma jkunx limitat għaliha: ħin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimi oħra. Għalkemm l-identità tal-kampjun tat-test mhix ir-responsabbiltà tal-laboratorju tat-test, jista' jkun prudenti għal-laboratorju tat-test li jikkonferma l-karatterizzazzjoni tal-isponser mill-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

23. L-atmosfera ta' espożizzjoni għandha tinżamm kemm prattikabbilment kostanti u tkun immonitorjata kontinwament u/jew f'intervalli skont il-metodu ta' analiżi. Meta jittieħed kampjun f'intervalli, il-kampjuni tal-atmosfera tal-kamra għandhom jittieħdu mill-anqas darbtejn għal studju ta' erba' sigħat. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minħabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew konċentrazzjonijiet baxxi, jista' jinġabar kampjun wieħed tul il-perjodu kollu ta' espożizzzjoni. Jekk iseħħ ċaqliq minn kampjun għal

▼M4

kampjun, il-konċentrazzjonijiet ittestjati li jkun imiss għandhom jużaw erba' kampjuni għal kull espożizzjoni. Kampjuni individwali ta' konċentrazzjonijiet tal-kamra m'għandhomx jiddevjaw mill-konċentrazzjoni medja b'aktar minn ± 10 % għall-gassijiet u l-fwar jew ± 20 % għal aerosols likwidi jew solidi. L-ekwilibrazzjoni ta' ħin ma' kamra (t_{95}) għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-ħin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata u din tqis il-ħinijiet meħtieġa biex jinkiseb t_{95}. Il-gwida għall-istima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (2).

24. Għal taħlitiet kumplessi ħafna li jikkonsistu f'gassijiet/fwar, u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodotti/mezzi ta' użu finali b'għan speċifiku), kull fażi tista' taġixxi b'mod differenti f'kamra tal-inalazzjoni, għalhekk għandha tintgħażel mill-anqas sustanza (analita) waħda bħala indikatur, normalment is-sustanza attiva prinċipali fit-taħlita, ta' kull fażi (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun taħlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-taħlita u mhux biss għas-sustanza jew għall-komponent (analita). L-informazzjoni addizzjonali dwar il-konċentrazzjonijiet attwali tinsab f'GD 39 (2).

Kimika għall-ittestjar: Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli

25. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas darbtejn matul kull espożizzjoni ta' 4 sigħat billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv bħall-għodda ajrudinamika li tagħti d-daqs tal-partiċelli. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza tar-riżultati miksubin minn impattur kaskata jew strument alternattiv, f'dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista' jintuża tul l-istudju kollu. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża b'mod parallell mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-ġbir. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi tad-daqs tal-partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi b'filtru [ara GD 39 (2)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-fażi bikrija tal-istudju, f'dak il-każ il-kejlijiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jitħallew barra. Għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista' twassal għal ħtieġa ta' ripetizzjoni ta' espożizzjoni. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista' tirriżulta kondensazzjoni ta' fwar fil-formazzjoni ta' aerosol, jew jekk jinstabu partiċelli f'atmosfera ta' fwar b'potenzjal għal fażijiet imħallta (ara l-paragrafu 15).

PROĊEDURA

26. Żewġ tipi ta' studji huma deskritti hawn taħt: il-protokoll Tradizzjonali u l-protokoll C × t. Iż-żewġ protokolli jistgħu jinkludu studju ta' osservazzjoni, studju ewlieni, u/jew test ta' limitu (protokoll Tradizzjonali) jew ittestjar f'konċentrazzjoni limitata (C × t). Jekk ikun magħruf li wieħed miż-żewġ sessi jkun aktar suxxettibbli, id-direttur tal-istudji jista' jagħżel li jwettaq dawn l-istudji billi juża biss is-sess suxxettibbli. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Qabel il-bidu, għandha titqies id-dejta kollha disponibbli biex l-użu ta' annimali jkun mill-anqas. Pereżempju, dejta ġġenerata bl-użu tal-kapitolu B.52 ta' dan l-Anness (4) tista' telimina l-ħtieġa ta' studju ta' osservazzjoni, u tista' wkoll turi jekk wieħed miż-żewġ sessi jkunx aktar suxxettibbli [ara GD 39 (2)].

▼M4

PROTOKOLL TRADIZZJONALI

Konsiderazzjonijiet ġenerali: Protokoll tradizzjonali

27. Fi studju tradizzjonali, il-gruppi ta' annimali jkunu esposti għal kimika għall-ittestjar għal perjodu fiss ta' żmien (ġeneralment 4 sigħat) f'kamra tal-espożizzjoni mill-imnieħer biss jew mill-ġisem kollu. L-annimali jkunu esposti għal konċentrazzjoni limitata (test ta' limitu), jew għal mill-anqas tliet konċentrazzjonijiet fi proċedura pass pass (studju ewlieni). Studju ta' osservazzjoni jista' jiġi qabel studju ewlieni sakemm ma tkunx teżisti diġà xi informazzjoni dwar il-kimika għall-ittestjar, bħal studju B.52 li jkun sar qabel [ara GD 39 (2)].

Studju ta' osservazzjoni: Protokoll tradizzjonali

28. Studju ta' osservazzjoni jintuża biex tkun stmata l-qawwa ta' kimika għall-ittestjar, biex ikunu identifikati d-differenzi sesswali fis-suxxettibbiltà, u biex jassisti fl-għażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni ta' espożizzjoni għall-istudju ewlieni jew għat-test tal-limitu. Meta tkun qed issir l-għażla tal-livelli ta' konċentrazzjoni għall-istudju ta' osservazzjoni, għandha tintuża l-informazzjoni kollha disponibbli, inkluża dejta (Q)SAR u dejta għal kimiċi simili. M'għandhomx ikunu esposti aktar minn tliet irġiel u tliet nisa f'kull konċentrazzjoni (jista' jkun hemm ħtieġa ta' 3 annimali/sess biex tkun stabbilita d-differenza sesswali). Studju ta' osservazzjoni jista' jikkonsisti f'konċentrazzjoni waħda, iżda jistgħu jiġu ttestjati aktar konċentrazzjonijiet jekk ikun meħtieġ. Studju ta' osservazzjoni m'għandux jittestja tant annimali u konċentrazzjonijiet li jkun jixbah studju ewlieni. Jista' jintuża studju B.52 li kien sar qabel (4) minflok studju ta' osservazzjoni [ara GD 39 (2)].

Test ta' limitu: Protokoll tradizzjonali

29. Test ta' limitu jintuża meta l-kimika għall-ittestjar tkun magħrufa jew tkun mistennija li tkun prattikament mhux tossika, jiġifieri li tislet rispons tossiku 'l fuq biss mill-konċentrazzjoni regolatorja tal-limitu. F'test ta' limitu, grupp wieħed ta' tliet irġiel u tliet nisa jkun espost għall-kimika għall-ittestjar f'konċentrazzjoni limitata. L-informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar tista' tinkiseb minn tagħrif dwar kimiċi ttestjati bl-istess mod, filwaqt li jitqiesu l-identità u l-perċentwali ta' komponenti magħrufin li jkunu ta' sinifikat tossikoloġiku. F'dawk is-sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ftit jew ebda informazzjoni dwar it-tossiċità tagħha, jew fejn il-kimika għall-ittestjar hija mistennija li tkun tossika, għandu jsir it-test ewlieni.

30. L-għażla ta' konċentrazzjonijiet ta' limitu normalment tiddependi minn rekwiżiti regolatorji. Meta jintuża r-Regolament (KE) Nru 1272/2008, il-konċentrazzjonijiet ta' limitu għall-gassijiet, il-fwar u l-aerosols jkunu ta' 20 000 ppm, 20 mg/l u 5 mg/l, rispettivament (jew il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb) (3). Tista' tkun ta' sfida teknika li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet ta' limitu ta' xi kimiċi għall-ittestjar, speċjalment bħala fwar u aerosols. Meta jkunu ttestjati l-aerosols, l-għan primarju għandu jkun li jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs (MMAD ta' 1-4 μm). Dan huwa possibbli għal kważi l-kimiċi kollha għall-ittestjar f'konċentrazzjoni ta' 2 mg/l. L-ittestjar ta' aerosols f'aktar minn 2 mg/l għandu jkun ittentat biss jekk ikun jista' jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs [ara GD 39 (2)]. Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 jiskuraġġixxi l-ittestjar li jeċċedi konċentrazzjoni limitata għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali (3). Il-konċentrazzjoni limitata għandha titqies biss meta jkun hemm probabbiltà kbira li riżultati ta' test bħal dan ikun se jkollhom rilevanza diretta għall-protezzjoni tas-saħħa tal-bniedem (3), u tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta' studju. Fil-każ ta' kimiċi għall-ittestjar potenzjalment esplożivi, għandha tingħata attenzjoni biex ikunu evitati kundizzjonijiet favorevoli għal splużjoni. Biex ikun evitat l-użu mhux meħtieġ tal-annimali, għandu jsir test ta' prova mingħajr l-annimali qabel it-test ta' limitu sabiex ikun żgurat li l-kundizzjonijiet tal-kamra għat-test ta' limitu jkunu jistgħu jinkisbu.

▼M4

31. Jekk ikunu osservati mortalità jew annimali moribondi fil-konċentrazzjoni limitata, ir-riżultati tat-test ta' limitu jistgħu jservu bħala studju ta' osservazzjoni għal ittestjar ulterjuri f'konċentrazzjonijiet oħra (ara l-istudju ewlieni). Jekk il-proprjetajiet fiżiċi jew kimiċi ta' kimika għall-ittestjar jagħmluha impossibbli li tinkiseb konċentrazzjoni limitata, għandha tiġi ttestjata l-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb. Jekk ikun hemm anqas minn 50 % ta' letalità fil-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb, ma jkunx meħtieġ aktar ittestjar. Jekk il-konċentrazzjoni limitata ma' kinitx tista' tinkiseb, ir-rapport ta' studju għandu jipprovdi spjegazzjoni u dejta ta' sostenn. Jekk il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb ta' fwar ma tislitx tossiċità, jista' jkun meħtieġ li tkun iġġenerata kimika għall-ittestjar bħala aerosol likwidu.

Studju ewlieni: Protokoll tradizzjonali

32. Studju ewlieni tipikament isir billi jintużaw ħames irġiel u ħames nisa (jew 5 annimali tas-sess suxxettibbli, jekk ikun magħruf) għal kull livell ta' konċentrazzjoni, b'mill-anqas tliet livelli ta' konċentrazzjoni. Għandhom jintużaw livelli suffiċjenti ta' konċentrazzjoni biex tinkiseb analiżi robusta tal-istatistika. L-intervall ta' żmien bejn il-gruppi ta' espożizzjoni huwa determinat malli jfaqqgħu s-sinjali tossiċi, kemm idumu u s-severità tagħhom. L-espożizzjoni tal-annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha titħalla għal aktar tard sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli ta' sopravivenza għall-annimali li jkunu ġew ittestjati qabel. Dan jippermetti lid-direttur tal-istudju jaġġusta l-konċentrazzjoni mmirata għall-grupp ta' espożizzjoni li jkun imiss. Minħabba d-dipendenza fuq teknoloġiji sofistikati, dan mhux dejjem jista' jkun prattikabbli fi studji dwar l-inalazzjoni, għalhekk l-espożizzjoni tal-annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha tkun ibbażata fuq esperjenza preċedenti u fuq ġudizzju xjentifiku. GD 39 (2) għandu jkun ikkonsultat meta jkunu ttestjati it-taħlitiet.

PROTOKOLL TAL-KONĊENTRAZZJONI X ĦIN (C × T)

Konsiderazzjonijiet ġenerali: Protokoll C × t

33. Studju C × t pass pass jista' jitqies bħala alternattiva għall-protokoll Tradizzjonali għall-valutazzjoni tat-tossiċità tal-inalazzjoni (12) (13) (14). Dan l-approċċ jippermetti li l-annimali jkunu esposti għal kimika għall-ittestjar f'diversi livelli ta' konċentrazzjoni u għal durati multipli ta' żmien. L-ittestjar kollu jsir f'kamra għall-imnieħer biss (kmamar għall-ġisem kollu mhumiex prattiċi għal dan il-protokoll). Dijagramma tal-fluss tagħti illustrazzjoni ta' dan il-protokoll fl-Appendiċi 1. Analiżi ta' simulazzjoni wriet li l-protokoll Tradizzjonali u l-protokoll C × t it-tnejn huma kapaċi jrendu valuri robusti ta' LC_{50}, iżda l-protokoll C × t huwa ġeneralment aħjar biex irendi valuri robusti ta' LC_{01} u LC_{10} (15).

34. Analiżi ta' simulazzjoni wriet li l-użu ta' żewġ annimali għal kull intervall ta' C × t (wieħed għal kull sess billi jintużaw iż-żewġ sessi, jew tnejn tas-sess l-aktar suxxettibbli) jista' ġeneralment ikun adegwat meta jkunu ttestjati durati ta' 4 konċentrazzjonijiet u 5 espożizzjonijiet fi studju ewlieni. F'xi ċirkostanzi, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża żewġ firien għal kull sess għal kull intervall C × t (15). L-użu ta' 2 annimali għal kull sess għal kull konċentrazzjoni u punt ta' ħin jista' jnaqqas il-parzjalità u l-varjabbiltà tal-istimi, iżid ir-rata ta' suċċess tal-istimi, u jtejjeb il-kopertura tal-intervall ta' kunfidenza. Iżda f'każ li dan ma jkunx suffiċjenti biex jaqbel eżatt mad-dejta għall-istima (meta jintuża annimal wieħed għal kull sess jew żewġ annimali tas-sess l-aktar suxxettibbli) tista' wkoll tkun biżżejjed il-ħames (5) espożizzjoni ta' konċentrazzjoni. Gwida ulterjuri dwar l-għadd ta' annimali u konċentrazzjonijiet li għandhom jintużaw fi studju C × t tinsab f'GD 39 (2).

▼M4

Studju ta' osservazzjoni: Protokoll C × t

35. Studju ta' osservazzjoni jintuża biex tkun stmata l-qawwa ta' kimika għall-ittestjar u biex jassisti fl-għażla tal-livelli ta' konċentrazzjoni ta' espożizzjoni għall-istudju ewlieni. Jista' jkun meħtieġ studju ta' osservazzjoni li juża sa tliet annimali/sess/konċentrazzjoni [għad-dettalji ara l-Appendiċi III ta' GD 39 (2)] biex tintgħażel il-konċentrazzjoni tal-bidu adattata għall-istudju ewlieni u biex ikun imminimizzat l-għadd ta' annimali użati. Jista' jkun meħtieġ li jintużaw tliet annimali għal kull sess biex tkun stabbilita differenza sesswali. Dawn l-annimali għandhom ikunu esposti għal durata waħda, ġeneralment ta' 240 minuta. Il-fattibbiltà tal-ġenerazzjoni tal-atmosfera adegwata tat-testijiet għandha tkun ivvalutata matul testijiet tekniċi li jsiru qabel mingħajr annimali. Ġeneralment ma jkunx meħtieġ li jsir studju ta' osservazzjoni jekk tkun disponibbli dejta tal-mortalità mill-istudju B.52 (4). Meta tkun qed issir l-għażla tal-konċentrazzjoni inizjali mmirata fl-istudju B.2, id-direttur tal-istudju għandu jqis ix-xejriet tal-mortalità osservati f'kull studju B.52 disponibbli (4) għaż-żewġ sessi u għall-konċentrazzjonijiet kollha ttestjati [ara GD 39 (2)].

Konċentrazzjoni inizjali: Protokoll C × t

36. Il-konċentrazzjoni inizjali (Sessjoni ta' Espożizzjoni I) (Appendiċi 1) tkun konċentrazzjoni limitata jew konċentrazzjoni magħżula mid-direttur tal-istudju abbażi tal-istudju ta' osservazzjoni. Il-gruppi ta' annimal wieħed/sess wieħed ikunu esposti għal din il-konċentrazzjoni għal durati multipli (eż. 15, 30, 60, 120, jew 240 minuta), li jirriżultaw f'għadd totali ta' 10 annimali (msejħa s-Sessjoni ta' Espożizzjoni I) (Appendiċi 1).

37. L-għażla ta' konċentrazzjonijiet limitati normalment tiddependi minn rekwiżiti regolatorji. Meta jintuża r-Regolament (KE) Nru 1272/2008, il-konċentrazzjonijiet limitati għall-gassijiet, il-fwar u l-aerosols jkunu ta' 20 000 ppm, 20 mg/l u 5 mg/l, rispettivament (jew il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb) (3). Tista' tkun ta' sfida teknika li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet ta' limitu ta' xi kimiċi għall-ittestjar, speċjalment bħala fwar u aerosols. Meta jkunu ttestjati l-aerosols, l-għan għandu jkun li jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs (jiġifieri MMAD ta' 1-4 μm) f'konċentrazzjoni limitata ta' 2 mg/l. Dan huwa possibbli b'ħafna mill-kimiċi għall-ittestjar. L-ittestjar tal-aerosols f'aktar minn 2 mg/l għandu jkun ippruvat biss jekk ikun jista' jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs [ara GD 39 (2)]. Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 jiskuraġġixxi l-ittestjar li jeċċedi konċentrazzjoni limitata għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali (3). L-itestjar li jeċċedi l-konċentrazzjoni limitata għandu jitqies biss meta jkun hemm probabbiltà kbira li r-riżultati ta' test bħal dan se jkollhom rilevanza diretta għall-protezzjoni tas-saħħa tal-bniedem (3), u għandha tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta' studju. Fil-każ ta' kimiċi għall-ittestjar potenzjalment esploživi, għandha tingħata attenzjoni biex ikunu evitati kundizzjonijiet favorevoli għal splużjoni. Biex ikun evitat l-użu mhux meħtieġ tal-annimali, għandha titwettaq eżekuzzjoni tat-test mingħajr annimali qabel l-ittestjar fil-konċentrazzjoni inizjali biex ikun żgurat li l-kundizzjonijiet tal-kamra għal din il-konċentrazzjoni jkunu jistgħu jinkisbu.

38. Jekk ikunu osservati mortalità jew annimali moribondi fil-konċentrazzjoni inizjali, ir-riżultati f'din il-konċentrazzjoni jistgħu jservu bħala punt tat-tluq għall-ittestjar ulterjuri f'konċentrazzjonijiet oħra (ara l-istudju ewlieni). Meta l-proprjetajiet fiżiċi jew kimiċi ta' kimika għall-ittestjar jagħmluha impossibbli li tinkiseb konċentrazzjoni limitata, il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb għandha tiġi ttestjata. Jekk ikun hemm anqas minn 50 % ta' letalità fil-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb, ma jkunx meħtieġ aktar ittestjar. Jekk il-konċentrazzjoni limitata ma' kinitx tista' tinkiseb, ir-rapport ta' studju għandu jipprovdi spjegazzjoni u dejta ta' sostenn. Jekk il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb ta' fwar ma tislitx tossiċità, jista' jkun meħtieġ li tkun iġġenerata kimika għall-ittestjar bħala aerosol likwidu.

▼M4

Studju ewlieni: Protokoll C × t

39. Il-konċentrazzjoni inizjali (Sessjoni ta' Espożizzjoni I) (Appendiċi 1) ittestjata fl-istudju ewlieni tkun konċentrazzjoni limitata jew konċentrazzjoni magħżula mid-direttur tal-istudju abbażi tal-istudju ta' osservazzjoni. Jekk tqkun ġiet osservata mortalità matul jew wara s-Sessjoni ta' Espożizzjoni I, l-espożizzjoni minima (C × t) li tirriżulta f'mortalità titthieħed bħala gwida biex tkun stabbilità l-konċentrazzjoni u l-perjodi ta' espożizzjoni għas-Sessjoni ta' Espożizzjoni II. Kull Sessjoni ta' Espożizzjoni sussegwenti tkun tiddependi mis-sessjoni ta' qabel (ara l-Appendiċi 1).

40. Għal ħafna kimiċi għall-ittestjar ir-riżultati miksubin fil-konċentrazzjoni inizjali, flimkien ma' tliet sessjonijiet ta' espożizzjoni addizzjonali b'distribuzzjoni anqas ta' ħin (jiġifieri l-ispazjar ġeometriku ta' perjodi ta' espożizzzjoni kif indikat mill-fattur bejn perjodi suċċessivi, ġeneralment √2), għandhom ikunu suffiċjenti biex tkun stabbilita r-relazzjoni ta' mortalità C × t (15), iżda jista' jkun hemm xi benefiċċju għall-użu ta' ħames (5) konċentrazzjoni ta' espożizzjoni [ara l-Appendiċi 1 u GD 39 (2)]. Għal trattament matematiku tar-riżultati għall-protokoll C × t, ara l-Appendiċi 1.

OSSERVAZZJONIJIET

41. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament sikwit matul il-perjodu ta' espożizzzjoni. Wara espożizzjoni, l-osservazzjonijiet kliniċi għandhom isiru mill-anqas darbtejn fil-jum tal-espożizzjoni jew aktar sikwit meta indikat mir-rispons tal-annimali għat-trattament, u mill-anqas darba kuljum minn hemm 'il quddiem għal total ta' 14-il jum. It-tul tal-perjodu ta' osservazzjoni ma jkunx iffissat, iżda għandu jkun iddeterminat min-natura u miżżmien meta jfaqqgħu s-sinjali kliniċi u mit-tul tal-perjodu ta' rkupru. Id-drabi li fihom jidhru u jgħibu s-sinjali ta' tossiċità huma importanti, l-aktar jekk ikun hemm tendenza li s-sinjali ta' tossiċità jdumu ma jidhru. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati sistematikament b'reġistri individwalment miżmumin għal kull annimal. L-annimali li jinstabu li jkunu f'kondizzjoni moribonda u annimali li juru uġigħ sever u/jew sinjali li jdumu ta' diffikultà għandhom jinqatlu b'mod uman għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali. Għandha tingħata attenzjoni meta jsiru eżamijiet għal sinjali kliniċi ta' tossiċità biex meta jidhru ftit għall-bidu u jkun hemm bidliet respiratorji li jgħaddu malajr, li jiġu minn proċedura ta' espożizzjoni, wieħed ma jiħux żball u jaħsibhom tossiċità relatata ma' kimika għall-ittestjar li tkun teħtieġ il-qtil prematur tal-annimali. Għandhom jitqiesu l-prinċipji u l-kriterji sommarji fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (GD 19) (7). Meta l-annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.

42. L-osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn u l-membrani mukuża, u wkoll fis-sistema respiratorja, ċirkulatorja, awtonomika u nervuża ċentrali, u fl-attività somatomotorja u x-xejriet ta' mġiba. Meta jkun possibbli, għandha tkun innotata kull divrenzjazzjoni bejn l-effetti lokali u sistemiċi. L-attenzjoni għandha tkun diretta għal osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulżjonijiet, tbeżliq, dijarea, letarġija, irqad u koma. Il-kejl tat-temperatura tar-rektum jista' jipprovdi evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ipo/ipertermja relatati mat-trattament jew l-għeluq.

Piżijiet tal-ġisem

43. Il-piżijiet individwali ta' kull annimal għandhom jiġu rreġistrati darba matul il-perjodu ta' akklimatazzjoni, fil-jum ta' espożizzjoni qabel l-espożizzjoni (jum 0), u mill-anqas fil-jiem 1, 3 u 7 (u kull ġimgħa minn hemm 'il quddiem), u fil-ħin tal-mewt jew ewtanasja jekk jaqbżu l-ewwel (1) jum. Il-piż tal-ġisem huwa rikonoxxut bħala indikatur kritiku tat-tossiċità, għalhekk annimali li juru tnaqqis sostnut ta' > 20 %, meta mqabbel ma' valuri ta' qabel l-istudju, għandhom ikunu mmonitorjati mill-qrib. L-annimali li jibqgħu ħajjin jintiżnu u jinqatlu b'mod uman fi tmiem il-perjodu ta' wara l-espożizzjoni.

▼M4

Patoloġija

44. L-annimali kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jinqatlu bl-ewtanasja u jitneħħew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal awtopsja makroskopika. Jekk ma tkunx tista' ssir l-awtopsja minnufih wara li jkun instab annimal mejjet, l-annimal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperaturi baxxi biżżejjed biex tkun imminimizzata l-awtoliżi. L-awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopiċi kollha għandhom jiġu rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.

45. L-eżamijiet addizzjonali inklużi a priori dawk imfasslin apposta jistgħu jitqiesu li jestendu l-valur interpretattiv tal-istudju, bħall-kejl tal-piż tal-pulmun ta' firien li jkunu baqgħu ħajjin, u/jew li jipprovdu evidenza ta' irritazzjoni b'eżami mikroskopiku tas-sistema respiratorja. L-organi eżaminati jistgħu jinkludu wkoll dawk li juru evidenza ta' patoloġija makroskopika f'annimali li jibqgħu jgħixu għal 24 siegħa jew aktar, u organi magħrufin jew mistennija li jkunu affettwati. L-eżami mikroskopiku tas-sistema respiratorja kollha jista' jipprovdi informazzjoni utli dwar kimiċi għall-ittestjar li huma reattivi mal-ilma, bħal aċidi u kimiċi igroskopiċi għall-ittestjar.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

46. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwali fir-rigward tal-piżijiet tal-ġisem u s-sejbiet mill-awtopsji. Id-dejta dwar l-osservazzjonijiet kliniċi għandha tingħabar fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali użati, l-għadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali speċifiċi ta' tossiċità, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-ħin tal-mewt ta' annimali individwali, deskrizzjoni u kemm jieħdu żmien l-effetti tossiċi u r-riversibbiltà, u s-sejbiet mill-awtopsji.

Rapport tat-test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skont il-każ:

Annimali tat-test u trobbija

— Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: l-għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, il-materjal għall-irqad, it-temperatura ambjentali u l-umdità relattiva, il-fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta;

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far;

— Għadd, età u sess tal-annimali;

— Metodu ta' każwalità;

— Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma);

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test, inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard;

▼M4

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża l-isomerizzazzjoni);

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS), jekk ikunu magħrufa;

Vejjikolu

— Ġustifikazzjoni għal użu ta' vejjikolu u ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

— Dejta storika jew konkurrenti li turi li l-vejjikolu ma jfixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni tal-kamra tal-inalazzjoni inklużi d-dimensjonijiet u l-volum;

— Sors u deskrizzjoni tat-tagħmir użat għall-espożizzjoni tal-annimali kif ukoll għall-ġenerazzjoni tal-atmosfera;

— Tagħmir għall-kejl tat-temperatura, umdità, daqs tal-partiċelli u konċentrazzjoni attwali;

— Sors tal-arja u trattament tal-arja pprovduta/estratta u sistema użata għal kondizzjonament;

— Metodi użati għall-kalibrazzjoni tat-tagħmir biex tkun żgurata atmosfera omoġenea tat-test;

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva);

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieħer biss); tqegħid tal-annimali fis-sistema (il-ġisem kollu);

— Omoġeneità/stabbiltà temporali tal-atmosfera tat-test;

— Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u teħid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;

— Rati tal-fluss tal-arja, rata tal-fluss tal-arja/port ta' espożizzjoni (imnieħer biss), jew toqol tal-annimali/kamra (il-ġisem kollu);

— Informazzjoni dwar it-tagħmir użat għall-kejl tal-ossiġenu u tad-dijossidu tal-karbonju, jekk applikabbli;

— Ħin meħtieġ biex jintlaħaq ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t_{95})

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli);

Dejta ta' espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni;

— Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal ġol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra);

— Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-żona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal taħlitiet li jipproduċu forom fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament;

▼M4

— Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (eż. mg/l, mg/m^3, eċċ.); unitajiet ta' volum (eż. ppm, ppb, eċċ.) jistgħu wkoll ikunu rrappurtati f'parenteżi;

— Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli, dijametru ajrudinamiku ta' medja tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σg), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Għandha tkun irrappurtata analiżi waħda għal kull daqs ta' partiċelli;

Kundizzjonijiet tat-test

— Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kwalunkwe proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli ta' materjali solidi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar. F'każijiet fejn il-proċessi mekkaniċi jkunu setgħu biddlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkludi r-riżultati tal-analiżi li tivverifika l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— Deskrizzjoni (preferibbilment inkluża dijagramma) tat-tagħmir użat biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test u biex l-annimali jkunu esposti għall-atmosfera tat-test;

— Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u l-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-teħid tal-kampjuni);

— Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet tat-test;

Riżultati

— Tabulazzjoni tat-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss tal-arja;

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' konċentrazzjoni nominali u attwali tal-kamra;

— Tabulazzjoni tad-dejta dwar id-daqs tal-partiċelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli u l-kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g;

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' rispons u tal-livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, żmien ta' meta jfaqqgħu u kemm idumu l-effetti);

— Piżijiet tal-ġisem individwali tal-annimali miġburin għall-istudju; data u ħin tal-mewt jekk qabel l-ewtanasja skedata, kemm ikun għadda żmien minn meta faqqgħu s-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kinux riversibbli għal kull annimal;

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli;

— Stimi tal-letalità (eż. LC_{50}, LD_{01}) inklużi 95 % limiti ta' kunfidenza, u angolu (jekk ipprovdut mill-metodu ta' evalwazzjoni);

— Relazzjoni tal-istatistika, inkluża stima għall-esponent n (protokoll C × t). Għandu jkun ipprovdut l-isem tas-softwer tal-istatistika użat;

▼M4

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfażi partikolari għad-deskrizzjoni ta' metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-konċentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-partiċelli;

— Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni tal-partiċelli fid-dawl tas-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-partiċelli ma setgħux jitħarsu;

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm ħtieġa li b'mod uman jinqatlu l-annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (8);

— Jekk l-ittestjar skont il-kapitolu B.52 ta' dan l-Anness (4) ma baqax isir favur dan il-Metodu ta' Ttestjar B.2, għandhom ikunu pprovduti l-ġustifikazzjonijiet;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni tal-konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probbbali tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati.

LETTERATURA:

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1).

(4) Il-Kapitolu B.52 ta' dan l-Anness, Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta - Metodu ta' Klassi Akuta Tossika (ATC).

(5) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness: Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test ta' Reżistenza Elettrika Transkutanea (TER).

(6) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test Mudell tal-Ġilda Umana.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼M4

(11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 1

Protokoll C × t

1. Jista' jitqies studju pass pass ta' Konċentrazzjoni × Ħin (C × t) bħala alternattiva għall-protokoll Tradizzjonali biex tkun ivvalutata t-tossiċità tal-inalazzjoni (12) (13) (14). Dan għandu jsir b'mod preferenzjalment meta jkun hemm ħtieġa regolatorja jew xjentifika speċifika li ssejjaħ għall-ittestjar ta' annimali tul durati multipli ta' żmien bħal ta' ppjanar ta' rispons għal emerġenza jew ippjanar ta' użu ta' artijiet. Dan l-approċċ normalment jibda bl-ittestjar f'konċentrazzjoni limitata (is-Sessjoni ta' Espożizzjoni I) li fiha l-annimali jkunu esposti għal kimika għall-ittestjar għal ħames durati ta' ħin (eż. 15, 30, 60, 120 u 240 minuta) biex id-durati multipli ta' ħin jinkisbu f'Sessjoni ta' Espożizzjoni waħda (ara l-Figura 1). Meta jintuża r-Regolament (KE) Nru 1272/2008, il-konċentrazzjonijiet limitati għall-gassijiet, fwar u aerosols jkunu ta' 20 000 ppm, 20 mg/l, u 5 mg/l, rispettivament. Dawn il-livelli jistgħu jinqabżu biss jekk ikun hemm ħtieġa regolatorja jew xjentifika għall-ittestjar f'dawn il-livelli (ara l-paragrafu 37 fit-test ewlieni ta' B.2).

2. F'sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ftit jew l-ebda informazzjoni dwar it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar, għandu jsir studju ta' osservazzjoni li fih gruppi ta' mhux aktar minn 3 annimali għal kull sess ikunu esposti għal konċentrazzjonijiet immirati magħżula mid-direttur tal-istudju, ġeneralment ta' 240 minuta.

3. Jekk konċentrazzjoni limitata tkun ittestjata matul is-Sessjoni ta' Espożizzjoni I u tkun osservata mortalità ta' anqas minn 50 %, ma jkunx hemm ħtieġa ta' ttestjar addizzjonali. Jekk ikun hemm ħtieġa regolatorja jew xjentifika biex tkun stabbilità r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni/ħin/rispons f'livelli ogħla mill-konċentrazzjoni limitata indikata, l-espożizzjoni li jkun imiss għandha ssir f'livell ogħla bħall-konċentrazzjoni limitata għal darbtejn (jiġifieri 2L fil-Figura 1).

4. Jekk tkun osservata t-tossiċità fil-konċentrazzjoni limitata, ikun meħtieġ ittestjar addizzjonali (studju ewlieni). Ddawn l-eżpożizzjonijiet addizzjonali jitwettqu f'konċentrazzjonijiet iktar baxxi (fil-Figura 1; Sessjonijiet ta' Espożizzjoni II, III jew IV) jew f'konċentrazzjonijiet ogħla bl-użu ta' durati iqsar (fil-Figura 1: Sessjoni ta' Espożizzjoni IV) bl-użu ta' durati li huma adattati u mhux daqshekk spazjati.

5. It-test (konċentrazzjoni inizjali u konċentrazzjonijiet addizzjonali) isir billi jintuża annimal wieħed/sess wieħed għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin jew b'2 annimali tas-sess aktar suxxettibbli għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin. F'xi ċirkostanzi, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jutilizza 2 firien għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin (jew 4 annimali tas-sess suxxettibbli għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin) (15). L-użu ta' 2 annimali għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin ġeneralment inaqqas mill-parzjalità u mill-varjabbiltà tal-istimi, iżid ir-rata ta' suċċess ta' stimi, u jtejjeb il-kopertura ta' intervall ta' kunfidenza relattiva għall-protokoll kif deskritt hawn. Aktar dettalji jingħataw f'GD 39 (2).

6. Idealment, kull sessjoni ta' espożizzjoni ssir f'jum wieħed. Dan jagħti l-opportunità biex l-espożizzjoni li jkun imiss titħalla għal aktar tard sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli ta' sopravivenza, u tippermetti lid-direttur tal-istudju jaġġusta l-konċentrazzjoni mmirata u d-durati għas-sessjoni ta' espożizzjoni li jkun imiss. Qed jiġi rrakkomandat li kull sessjoni ta' espożizzjoni tinbeda mal-grupp li se jkun espost l-iżjed fit-tul, jiġifieri l-grupp ta' espożizzjoni ta' 240 minuta, warajh il-grupp ta' espożizzjoni ta' 120 minuta, eċċ. Jekk, pereżempju, l-annimali fil-grupp tal-240 minuta jibdew imutu wara 90 minuta jew juru sinjali severi ta' tossiċità (eż. tibidl estrem fix-xjera tat-teħid tan-nifs bħal nifs bi tbagħtija), ma jagħmilx sens li grupp jiġi espost għal 120 minuta għaliex il-mortalità proabbilment tkun 100 %. Għalhekk id-direttur tal-istudju għandu jagħżel durati iqsar ta' espożizzjoni għal dik il-konċentrazzjoni (eż. 90, 65, 45, 33 u 25 minuta).

▼M4

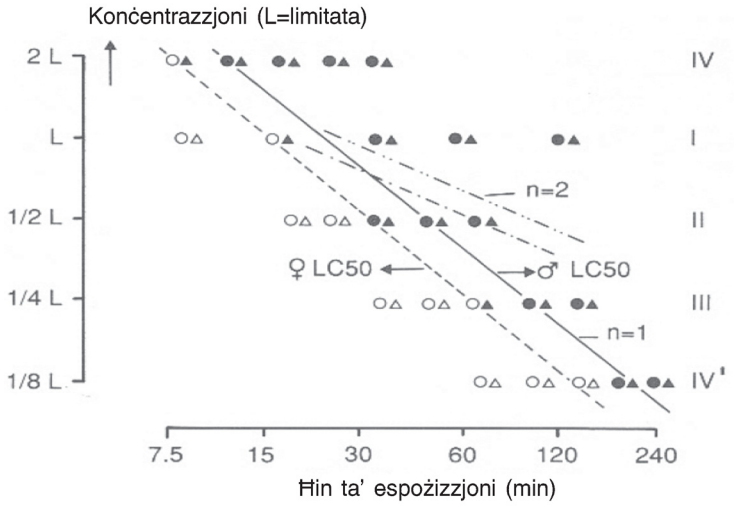
7. Il-konċentrazzjoni tal-kamra għandha titkejjel ta' spiss biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni medja peżata mal-ħin għal kull perjodu ta' espożizzjoni. Kull meta jkun possibbli, għandu jintuża l-ħin tal-mewt ta' kull annimal (iktar milli d-durata ta' espożizzjoni) fl-analiżi ta' statistika.

8. Ir-riżultati tal-ewwel erba' sessjonijiet ta' espożizzjoni għandhom ikunu eżaminati biex tkun identifikata differenza fid-dejta fil-kurva ta' konċentrazzjoni-ħin (ara l-Figura 1). F'każ li ma jkunx hemm qbil biżżejjed, tkun tista' ssir espożizzjoni addizzjonali (il-ħames (5) konċentrazzjoni). Għandhom jintgħażlu durati ta' konċentrazzjoni u espożizzjoni għall-ħames espożizzjoni (5) biex ikopru din id-differenza.

9. Is-sessjonijiet ta' espożizzjoni kollha (inkluża l-ewwel Sessjoni ta' Espożizzjoni) jintużaw biex tkun ikkalkulata r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni-ħin-rispons billi tintuża Analiżi ta' Statistika (16). Jekk ikun possibbli, għal kull intervall C × t, għandhom jintużaw il-konċentrazzjoni medja peżata mal-ħin u d-durata ta' espożizzjoni sal-mewt (jekk il-mewt isseħħ matul l-espożizzjoni).

Figura 1

Illustrazzjoni ipotetika tar-relazzjoni ta' konċentrazzjoni-ħin-mortalità fil-firien.



Simboli miftuħa = superstiti; simboli magħluqa = annimali mejta

Trijangli = nisa; ċrieki = rġiel

Linja kontinwa = valuri LC_{50} (firxa 7,5-240 min) għall-irġiel b'n = 1

Linja maqsuma = valuri LC_{50} (firxa 7,5-240 min) għan-nisa b'n = 1

Linji ttikkjati = linji ta' valuri LC_{50} ipotetiċi għall-irġiel u għan-nisa jekk n kienet ugwali għal 2 (12).

Glossarju

Konċentrazzjoni:

Ħin ta' espożizzjoni:

▼M4

10. Hawn taħt hawn eżempju tal-proċedura pass pass:

Sessjoni ta' Espożizzjoni I – Ittestjar fil-konċentrazzjoni limitata (ara l-Figura 1)

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ([a])

— Konċentrazzjoni ([b]) = konċentrazzjoni limitata.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'din il-konċentrazzjoni mmirata għal durati ta' 15, 30, 60, 120 u 240 minuta, rispettivament.

↓

Sessjoni ta' Espożizzjoni II ([c]) – Studju Ewlieni

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ta' 10 annimali.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni ([d]) (1/2L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur √2 spazjat; ara l-Figura 1).

↓

Sessjoni ta' Espożizzjoni III – Studju Ewlieni

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ta' 10 annimali.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni ([d]) (1/4L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur √2 spazjat; ara l-Figura 1).

↓

Sessjoni ta' Espożizzjoni IV' – Studju Ewlieni

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ta' 10 annimali.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni ([d]) (1/8L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur √2 spazjat; ara l-Figura 1).

↓ jew

([a]) Jekk ma tkunx disponibbli informazzjoni dwar is-suxxettibbiltà tas-sessi, jintużaw firien taż-żewġ sessi, jiġifieri annimal wieħed/sess wieħed għal kull konċentrazzjoni. Abbażi ta' informazzjoni eżistenti, jew jekk ikun jidher biċ-ċar matul din is-sessjoni ta' espożizzjoni li sess ikun aktar suxxettibbli mill-ieħor, għandhom jintużaw 10 annimali mis-sess suxxettibbli (2 annimali għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin) f'kull livell ta' konċentrazzjoni matul l-ittestjar sussegwenti. ta' 10 annimali

([b]) Meta jintuża r-Regolament (KE) Nru 1272/2008, il-konċentrazzjonijiet ta' limitu għall-gassijiet, il-fwar u l-aerosols huma 20 000 ppm, 20 mg/l u 5 mg/l, rispettivament. F'każ ta' tossiċità mistennija jew ibbażata fuq ir-riżultati tal-istudju ta' osservazzjoni, għandhom jintgħażlu konċentrazzjonijiet tal-bidu aktar baxxi. F'każ ta' ħtiġijiet regolatorji jew xjentifiċi, jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet oħla. mmirata

([c]) Idealment, l-espożizzjoni tal-annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha ssir aktar tard sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli ta' sopravivenza għal annimali li jkunu ġew ittrattati qabel. Dan jippermetti lid-direttur tal-istudju jaġġusta l-konċentrazzjoni mmirata u d-durati għas-sessjoni ta' espożizzjoni li tkun imiss.

([d]) Id-doża minima (konċentrazzjoni × ħin) li tkun irriżultat f'mortalità matul l-ittestjar fil-konċentrazzjoni inizjali (l-ewwel sessjoni ta' espożizzjoni) tittieħed bħala gwida biex tkun stabbilita t-taħlita li jkun imiss ta' konċentrazzjoni u d-durati ta' espożizzjoni. Tipikament, il-konċentrazzjoni għandha tonqos b'darbtejn (1/2L) u l-annimali jiġu esposti fuq firxa ġdida ta' ħin b'grid iktar fina li tuża diviżjoni ġeometrika ta' perjodi ta' espożizzjoni b'fattur ta' 1.4 (√2; ara r-referenza 11) matul il-ħin skont il-livell minimu tad-doża letali (ħin × konċnetrazzjoni) osservat matul l-ewwel espożizzjoni. F'din il-figura (Figura 1), il-mortalità fis-sessjoni ta' espożizzjoni I kienet osservata l-ewwel darba fil-15-il minuta; id-durati matul is-sessjoni II ikunu, għalhekk, huma ċċentrati għal madwar 30 minuta, u jkunu 15, 21 30, 42 u 60 minuta. Wara l-ewwel żewġ espożizzjonijiet, huwa rrakkomandat ħafna li d-dejta titfassal f'mod simili kif indikat hawn fuq, u li jkun ivverifikat jekk ir-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-ħin ikollhiex angolu ta' 45 grad (n = 1) jew jekk ir-relazzjoni ta' konċentrazzjoni-ħin-rispons tkunx anqas wieqfa (eż. n = 2) jew aktar wieqfa (eż. n = 0,8). Fil-każijiet tal-aħħar huwa rrakkomandat ħafna li l-konċentrazzjonijiet u d-durati li jkun imiss ikunu adattati bl-istess mod. aktar baxxa

▼M4

Sessjoni ta' Espożizzjoni IV – Studju Ewlieni

— 1 annimal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' ħin; total ta' 10 annimali.

— Esponi ħames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni (e) (2L) b'durati ta' espożizzjoni ftit aqsar (fattur √2 spazjat; ara l-Figura 1).

Trattament matematiku tar-riżultati għall-protokoll C × t

11. Il-proċedura ta' C × t b'4 jew 5 konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni u ħames durati trendi 20 jew 25 punt ta' dejta, rispettivament. B'dawn il-punti ta' dejta, ir-relazzjoni C × t tista' tkun ikkalkulata billi tintuża analiżi ta' statistika (16):

Ekwazzjoni 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

fejn C = konċentrazzjoni; t = perjodu ta' espożizzjoni, jew

Ekwazzjoni 2:

$$Reazzjoni = f(C^n t)$$

fejn $n = b_1/b_2$.

Bl-użu tal-ekwazzjoni 1, jista' jkun ikkalkulat il-valur LC_{50} għal perjodu ta' ħin partikolari (eż. 4 sigħat, siegħa 1, 30 minuta, jew kwalunkwe perjodu fil-firxa ta' perjodi ta' ħin ittestjati) bl-użu ta' P = 5 (50 % rispons). Innota li r-regola ta' Haber tapplika biss meta n = 1. LC_{01} jista' jkun ikkalkulat bl-użu ta' P = 2,67.

(e) F'ċerti każijiet jista' jkun meħtieġ li l-konċentrazzjoni tiżdied (2L) tul firxa ġdida ta' ħin bi grid terġa aktar fina bl-użu ta' diviżjoni ġeometrika ta' perjodi ta' espożizzjoni b'fattur ta' 1.4 (√2) f'dak il-ħin skont il-livell minimu tal-konċentrazzjoni letali osservat matul l-ewwel espożizzjoni. Id-durata minima ta' espożizzjoni għandha preferibbilment tkun aktar minn 5 minuti; id-durata massima ta' espożizzjoni m'għandhiex tkun aktar minn 8 sigħat."

▼B

B.3. **TOSSIĊITÀ AKUTA (DERMALI)**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (A).

1.2. DEFINIZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (B).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test tiġi applikata fuq il-ġilda f'doži ggradwati lil bosta gruppi ta' annimali sperimentali, doża waħda użata għal kull grupp. Sussegwentement, isiru l-osservazzjonijiet ta' l-effetti u ta' l-imwiet. L-annimali, li jmutu waqt it-test issirilhom in-nekropsija u fl-aħħar tat-test din issir fuq dawk l-annimali li baqgħu ħajjin.

Jista' jagħti l-każ li l-annimali li juru sinjali gravi u li jtulu ta' tbatija u uġigħ jinqatlu b'mod uman. Is-sustanzi għat-test f'dożaġġi magħrufa li jikkawżaw l-uġigħ u t-tbatija minħabba proprjetajiet korrużivi jew ta' irritazzjoni m'għandhomx għalfejn jitwettqu.

1.5. KRITERJI TAL-KWALITÀ

Xejn

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Preparazzjonijiet**

L-annimali huma miżmuma f'fondi sperimentali u f'kundizzjonijiet ta' l-għalf għal mill-anqas ħamest ijiem qabel l-esperiment. Qabel it-test, annimali adulti żgħażagħ b'saħħithom huma magħżula b'mod kif jinzerta u assenjati lejn gruppi għat-trattament. Xi ftit qabel it-testijiet, il-pil huwa maqtugħ miż-żona dorsali tad-dahar ta' l-annimali tat-test. It-tqaxxir jista' jkun użat imma għandu jkun imwettaq madwar 24 siegħa qabel it-test. Meta jsir il-qtugħ jew it-tqaxxir tal-pil, kura għandha tittieħed sabiex ikun evitat xi grif fil-ġilda li jkunu jistgħu jibdlu l-permeabbiltà tagħha. Mhux anqas minn 10 % tal-wiċċ tal-ġisem għandu jkun imnaddaf għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Meta jsiru testijiet tas-solidi, li jistgħu ikunu pulverizzati jekk xieraq, is-sustanza tat-test għandha tkun b'umidità suffiċjenti bl-ilma, jew, meta meħtieġ, apparat adattat sabiex jassigura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Meta jiġi użat xi mezz, għandha tiġi kkunsidrata l-influwenza tiegħu fuq il-penetrazzjoni tal-ġilda bis-sustanza għat-test. Is-sustanzi għat-test likwidi ġeneralment jintużaw mhux maħlula.

1.6.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.6.2.1. *Annimali sperimentali*

Firien jew fniek, jew fniek ta' l-indi adulti jistgħu jintużaw. Speċje oħrajn jistgħu jiġu użati imma l-użu tagħhom ikun jeħtieġ ġustifikazzjoni. Għandhom jintużaw karatteristiċi tal-laboratorju użati b'mod komuni. Fil-bidu ta' kull test, il-medda tal-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi ± 20 % tal-valur medju kif xieraq.

▼B

1.6.2.2. *Numru u sess.*

Mill-anqas 5 annimali huma użati f'kull livell tad-doża. Iridu jkunu ta' l-istess sess. Jekk jintużaw dawk femminili, dawn qatt ma jkunu welldu u mhumiex tqal. Fejn l-informazzjoni hija disponibbli li turi li s-sess partikulari huwa iktar sensittiv, l-annimali ta' dan is-sess għandhom jingħataw id-doża.

Nota: F'testijiet ta' tossiċità akuta b'annimali t'ordni ogħla minn tal-gerriema, l-użu ta' numri iżgħar għandu jiġi kkunsidrat. Id-dożi għandhom jingħażlu bl-attenzjoni, u għandu jsir kull sforz sabiex id-dożi li huma xi ftit tossiċi ma jinqabżux. F'testijiet bħal dawn, l-amministrazzjoni tad-dożi letali tas-sustanza għat-test għandha tiġi evitata.

1.6.2.3. *Livelli tad-doża*

Dawn għandhom ikunu biżżejjed bħala numru, mill-inqas tlieta, u spazjati b'mod xieraq sabiex jipproduċu gruppi ta' test b'medda ta' effetti tossiċi u rati ta' mortalità. Kwalunkwe effetti korrużivi jew ta' irritazzjoni għandhom jiġu kkunsidrati meta jiġu deċiżi l-livelli tad-doża. Id-data għandha tkun biżżejjed biex tipproduċi kurva li turi d-doża/ir-rispons u, fejn hu possibbli, tippermetti determinazzjoni aċċettabbli ta' l- LD_{50}

1.6.2.4. *Test ta' limitazzjoni*

Test ta' limitu f'livell wieħed ta' doża ta' mill-inqas 2 000 mg/kg ta' piż tal-ġisem jista' jitwettaq fi gruppi ta' 5 annimali maskili u 5 femminili, bl-użu tal-proċeduri deskritti hawn fuq. Jekk ikun hemm mortalità compound-related jista' jiġi kkunsidrat studju sħiħ.

1.6.2.5. *Perijodu ta' l-Osservazzjoni*

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun ta' mill-inqas 14-il jum. Madankollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandux ikun issettjat stret-tament. Għandu jkun determinat mir-reazzjonijiet tossiċi, ir-rata ta' *onset* tagħhom u t-tul tal-perjodu ta' rkupru, u għalhekk jista' jiġi estiż jekk ikun meħtieġ. Il-ħin li fih is-sinjali tat-tossiċità jidhru u jisparixxu, iż-żmien li jieħdu u l-ħin tal-mewt huma importanti, speċ-jalment jekk ikun hemm it-tendenza li jtulu l-imwiet.

1.6.3. **Il-proċedura**

L-annimali għandhom jinżammu f'gaġeġ individwali. Is-sustanza għat-test għandha tiġi applikata b'mod uniformi fuq żona, li hija bejn wieħed u ieħor 10 % taż-żona totali tal-wiċċ tal-ġisem B'sustanzi ferm tossiċi, iż-żona tal-wiċċ koperta tista' tkun anqas imma kemm jista' jkun miż-żona għandha tkun koperta b'saff irqieq u uniformi kemm jista' jkun possibbli

Matul l-24 siegħa tal-perjodu ta' l-espożizzjoni s-sustanza tat-test tinżamm f'kuntatt mal-ġilda b'garża poruża u faxxa mhux irri-tanti.Is-sit tat-test għandu jkun aktar kopert b'mod xieraq sabiex iżomm il-faxxex bil-garża u s-sustanza tat-test u jassiguraw li l-annimali ma jkunux jistgħu jilgħaqu u jieklu s-sustanza tat-test. Restrizzjonijiet jistgħu jintużaw sabiex jipprevjenu l-inġestjoni tas-sustanza tat-test, imma l-immobilizzazzjoni kompleta mhix metodu rakkommandat.

▼B

Fi tmiem il-perjodu ta' l-espożizzjoni, għandhom jitneħħew ir-residwi tas-sustanza għat-test, fejn hu prattikabbli, permezz ta' l-ilma jew xi metodu xieraq ieħor ta' tindif tal-ġilda.

L-osservazzjonijiet għandhom jiġu rrekordjati sistematikament kif isiru. Ir-rekords individwali għandhom jinżammu għal kull animal. L-osservazzjonijiet għandhom isiru ta' spiss fl-ewwel jum. Eżaminazzjoni klinika bil-galbu għandha ssir mill-inqas darba kull ġurnata ta' xogħol, l-osservazzjonijiet l-oħra għandhom isiru kuljum b'azzjonijiet xierqa sabiex jiġi minimizzat it-telf ta' annimali mill-istudju eż. In-nekropsija jew ir-refriġerazzjoni ta' dawk l-annimali li jinstabu mejta u l-iżolament jew il-qtil ta' annimali dgħajfa jew li qed imutu.

L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-ġilda u l-pil, fl-għajnejn u membrani mukożji, u anki fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċi u tas-sistema ċentrali tan-nervituri; l-attività somatomotori u l-istil ta' l-imġiba. Għandha tingħata attenzjoni partikulari għall-osservazzjoni ta' tkexkix, konvulżjonijiet, ir-rieq, dijareja, il-letarġija, l-irqad u l-koma. Il-ħin tal-mewt għandu jiġi rrekordjat kemm jista' jkun bl-eżatt. L-annimali li jmutu waqt it-test u dawk li jibqgħu ħajjin fi tmiem it-test huma suġġetti għan-nekropsija. It-tibdil kollu patoloġiku kbir għandu jiġi rrekordjat. Fejn hu indikat, it-tessuti għandhom jittieħdu għall-eżaminazzjoni ħispatoloġika.

Valutazzjoni tat-tossiċità fis-sess l-ieħor.

Wara tmiem l-istudju ta' sess wieħed, mill-inqas grupp wieħed ta' 5 annimali tas-sess l-ieħor jingħata d-doża biex jiġi stabbilit li l-annimali ta' dan is-sess mhumiex iktar sensittivi għas-sustanza tat-test. L-użu ta' inqas annimali jista' jkun ġustifikat f'ċirkostanzi individwali. Fejn hemm informazzjoni xierqa disponibbli li turi li l-annimali tas-sess li qed jiġi ttestjat huma iktar sensittivi, l-ittestjar fuq l-annimali tas-sess l-ieħor jista' ma jsirx.

2. **DATA**

Id-*data* għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, il-ħin tal-mewt ta' l-annimali individwali, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali oħra ta' tossiċità, id-deskrizzjoni ta' l-effetti tossiċi u s-sejbiet ta' nekropsija. Il-piżijiet individwali ta' l-annimali għandhom jiġu determinati u rrekordjati ftit qabel is-sustanza għat-test tiġi applikata. Wara, dan isir kull ġimgħa u mal-mewt it-tibdiliet fil-piż għandhom jiġu kkalkulati u rrekordjati meta l-annimali jibqgħu ħajjin sa ġurnata wara. L-annimali li jiġu maqtula b'mod uman minħabba t-tbatija u l-uġigħ li huma *compound related* huma rrekordjati bħala mwiet *compound-related*. L-LD_{50} għandu jiġi determinat minn metodu rikonoxxut.

Il-valutazzjoni tad-data għandha tinkludi l-valutazzjoni tar-relazzjonijiet, jekk ikun hemm, bejn l-espożizzjoni ta' l-annimali għas-sustanza tat-test u l-okkorrenza u l-gravità ta' l-anormalitajiet kollha, inklużi dawk ta' imġiba u dawk kliniċi, feriti kbar, tibdil fil-piż tal-ġisem, il-mortalità u kwalunkwe effetti tossiċi oħra.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk inhu possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼B

— l-ispeċje, is-silta, is-sors, il-kundizzjonijiet ambjentali, dieta, eċċ.;

— kundizzjonijiet tat-test (inklużu t-tip ta' faxex: okklussivi jew mhux okklussivi);

— il-livelli tad-doża (inkluż il-mezz, jekk użat, u l-konċentrazzjoninijiet);

— is-sess ta' l-annimal li qed jingħata d-doża;

— it-tabulazzjoni tad-data ta' rispons tas-sess u l-livell tad-doża (i.e. in-numru ta' l-annimali li mietu jew inqatlu waqt it-test; in-numru ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità; in-numru ta' annimali esposti);

— il-ħin tal-mewt wara d-dożaġġ, ir-raġunijiet u l-kriterji użati għall-qtil b'mod uman ta' l-annimali;

— l-osservazzjonijiet kollha;

— il-valur LD_{50} għas-sess suġġett għal studju komplet, determinat f'14-il jum bil-metodu ta' determinazzjoni speċifikat;

— 95 % ta' l-intervall ta' kunfidenza għall- LD_{50} (fejn dan huwa provdut);

— Il-kurva li turi id-doża/il-mortalità fejn hu permess bil-metodu tad-determinazzjoni

— Is-sejbiet tan-nekropsija;

— Kwalunkwe sejbiet ħispatoloġiċi;

— Ir-riżultati ta' kwalunkwe test fuq is-sess l-ieħor;

— Id-diskussjoni tar-riżultati (b'attenzjoni partikulari għall-effett li l-qtil b'mod uman ta' l-annimali jista' jkollu fuq il-valur kalkulat LD_{50});

— L-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (D).

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (E).

▼B

B.4. **TOSSIĊITÀ AKUTA: IRRITAZZJONI/KORRUŻJONITAL-ĠILDA**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalnti għal OECD TG 404 (2002)

1.1 INTRODUZZJONI

Fil-preparazzjoni ta' dan il-metodu aġġornat, attenzjoni speċjali kienet mogħtija għat-titjib possibbli b'relazzjoni ma dak li jikkonċerna l-ġid ta' l-annimali u ta' l-evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti kollha dwar is-sustanza tat-test sabiex ikunu evitati testijiet mingħajr ħtieġa ta' l-annimali fil-laboratorju. Dan il-metodu jinkludi r-rakkommandazzjonijiet li qabel ma jibda l-impenn deskritt għat-test *in vivo* dwar il-korrużjoni/irrirtazzjoni tas-sustanza, l-analiżi ta' l-evidenza peżata għandu jkun imwettaq skond id-dettalji relevanti eżistenti. Meta d-disponabbiltà ta' dettalji mhux suffiċċjenti, dawn jistgħu ikunu żviluppati permezz ta' l-applikazzjoni ta' testijiet sekwenzali (1). L-istrateġija tat-testijiet tinkludi t-twettieq ta' testijiet validati u aċċettabbli ta' *in vitro* u kemm provvediment dwarha bħala Anness ta' dan il-metodu. B'żieda, meta xieraq, l-applikazzjoni suċċessiva, minflok simultanja, tat-tlett impjastri tat-test fuq l-annimal, fit-test inizjali *in vivo*, hija rakkommandata.

Fl-interess kemm ta' xjenza għaqlija u tal-ġid ta' l-annimali, testijiet *in vivo* m'għandhomx iseħħu qabel ma d-dettalji relevanti disponibbli kollha dwar il-potenzal ta' korrossività/irritazzjoni tal-ġilda mis-sustanza jkunu ġew evalwati b'analiżi tal-peżar bl-evidenza. Tali dettalji għandhom jinkludu evidenza minn studju eżistenti kemm fuq il-bnedmin u/jew l-annimali tal-laboratorju, l-evidenza ta' korrossività/irritazzjoni ta' sustanza waħda struttarament relatati u it-taħlitiet ta' tali sustanzi, id-dettalji li juru aċidità jew alkalinità qawwija tas-sustanza (2) (3), u r-riżultati minn testijiet validati u aċċettati kemm *in vitro* jew *ex vivo* (4) (5) (5a). Din l-analiżi għandha tnaqqas il-ħtieġa ta' testijiet *in vivo* dwar is-sustanzi b'korrossività/irritazzjoni tal-ġilda li dwarha evidenza suffiċjenti tkun diġa eżistenti minn studju oħrajn rigward iż-żewġ għanijiet aħħarija.

Strateġija preferuta sekwenzali ta' testijiet, li tinkludi t-twettieq ta testijiet validati u aċċettabbli, *in vitro* jew *ex vivo*, dwar il-korrożjoni/irritazzjoni, hija inkluża bħala Anness għal dan il-metodu. L-istrateġija kienet żviluppata fi, u rakkommandata b'mod unanimu, mill-parteċipanti ta' laqgħa ta' studju ta' l-OECD (6), u kienet ġiet adottata bħala l-istrateġija rakkommandata tat-testijiet fis-Sistema Armonizzata Globali għall-Klassifika ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) (7). Huwa rakkommandabbli li din l-istrateġija tat-testijiet tkun segwita qabel ma jindew xi testijiet *in vivo*. Għal sustanzi ġodda huwa rakkommandabbli r-resqien ta' testijiet pass b'pass għall-iżvilupp ta' informazzjoni xjentifikament soda dwar il-korrosività/irritazzjoni mis-sustanza. Għal sustanzi eżistenti b'informazzjoni mhux suffiċjenti dwar il-korrożjoni/irritazzjoni tal-ġilda, l-istrateġija għanha tkun użata sabiex timla l-vojt fin-nuqqas tad-dettalji. L-użu ta' strateġija jew proċedura differenti tat-testijiet, jew ta' deċiżjoni li ma jkunx utilizzat it-test ta' pass b'pass, għandha tkun ġustifikata.

Jekk determinazzjoni tal-korrossività jew irritazzjoni ma tkuns tista' ssir bl-użu ta' l-analiżi tal-peżar ta' l-evidenza, konsistenti mal-istrateġija sekwenzali tat-testijiet, test *in vivo* għandu jkun ikkonsidrat (ara l-Anness).

▼B

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Irritazzjoni dermali (tal-ġilda): Hija l-produzzjoni ta' ħsara riversibbli tal-ġilda bħala segwiment ta' l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test għal 4 siegħat.

Korrożjoni dermali (tal-ġilda): Hija l-produzzjoni ta' ħsara irrevirsibbli tal-ġilda nekroži viżibbli mill-epidermis u sa ġewwa d-dermis, bħala segwiment ta' l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test għal sa 4 siegħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma tipifikati b'ulċeri, nixxija ta' demm, qoxra bid-demm, u, fit-tmiem ta' l-osservazzjoni matul 14-il jum, b'tibdil tal-kulur minħabba l-bjudija tal-ġilda, żoni sħaħ bi alopecia u farretti. Il-ħispatoloġija għandha tkun ikkonsidrata sabiex tevalwa feriti dubbjuži.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza li għandha tkun ittestjata hija applikata f'doża singola mal-ġilda ta' annimal sperimentli; żoni tal-ġilda mhux trattati ta' l-annimal tat-test iservu għall-kontroll. Il-grad tal-korrożjoni/-irritazzjoni ikun moqri u rreġistrat matul intervalli speċifiċi u jkun aktar deskritt sabiex jipprovdi evalwazzjoni sħiħa ta' l-effetti. It-tul ta' żmien ta' l-istudju għandu jkun suffiċjenti sabiex tkun evalwata r-riversabbilità jew in-nuqqas ta' riversabbilità ta' l-effetti osservati.

L-annimali li juru sinjali kontinwi ta' dwejjaq u/jew uġiegħ severi, fi kwalunkwe waqt tat-test, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju, u s-sustanza tkun assessjata kif xieraq. Il-kriterja sabiex tittieħed id-deċiżjoni li jkunu maqtula b'mod umanitarju l-annimali moribondi jew li jkunu jsofru ħafna tista' tinstgħab fir-referenza (8).

1.4 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **Preparazzjoni tat-test *in vivo***

1.4.1.1 *L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali*

Il-fenek albino huwa l-annimal preferut tal-laboratorju, u fniek żgħażagħ adulti huma użati. Ir-raġuni għall-użu ta' speċje oħrajn għandha tkun mogħtija.

1.4.1.2 *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Madwar 24 siegħa qabel it-test, is-suf għandu jkun imneħħi bi tqaxxir taż-żona dorsali minn fuq id-dhar ta' l-annimali. Kura għandha tingħata li jkunu evitati xi brix tal-ġilda, u biss l-anniamli li huma b'saħħithom, b'ġilda ntatta, għandhom ikunu użati.

Uħud mit-tip tal-fniek għandhom irqajja folti ta' suf li huma aktar prominenti f'ċerti żminijiet tas-sena. Tali żoni ta' tkabbir ta' suf folt m'għandhomx ikunu użati bħala s-siti tat-testijiet.

1.4.1.3 *Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf*

L-annimali għandhom jinzammi f'gaġġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 20 ºC (± 3 ºC), għall-fniek. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

▼B

1.4.2 **Proċedura tat-test**

1.4.2.1 *L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test*

Is-sustanza tat-test għandha tkun applikata fuq żona żgħira (madwar 6 cm^2) tal-ġilda u miksija b'biċċa garża, li tinżamm fil-post bi stikk mhux irritanti. Fil-każi meta l-applikazzjoni diretta ma tkunx possibbli (eż. likwidi u ċerti dlik), is-sustanza tat-test għandha l-ewwel tkun applikata fuq biċċa garża, li imbagħad tkun applikata mal-ġilda. Il-biċċa għandha tinżamm f'kuntatt ħafif mal-ġilda permezz ta' faxxa adattata semi-okklussiva, għal matul il-perjodu ta' l-espożizzjoni. Jekk is-sustanza tat-test tkun applikata fuq biċċa, din għandha tkun imwaħħla mal-ġilda b'tali mod li jkun hemm kuntatt tajjeb u distribuzzjoni uniformi tas-sustanza mal-ġilda. Aċċess mill-annimal lejn il-biċċa, jew l-inġestjoni li t-teħid mannifs tas-sustanza tat-test m'għandux jitħalla li jseħħ.

Is-sustanzi likwidi huwa ġeneralment użati mingħajr ma jkunu mrattba. Meta jsiru t-testijiet ta' solidi (li jistgħu ikunu pulverizzati, jekk hekk ikun meqjus bħala meħtieġ), is-sustanza tat-test għandha tkun niedja b'ammont żgħir ilma (jew, meta meħtieġ, b'xi likwidu adattat ieħor) li jkun suffiċjenti sabiex jassigura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Meta likwidi oħrajn apparti milli l-ilma jkunu użati, l-influwenza potenzali tal-likwidu fuq l-irritazzjoni tal-ġilda mis-sustanza tat-test għand tkun ferm minima, jekk ikun hemm.

Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, li normalment ikun ta' 4 siegħat, is-sustanza residwa tat-test għandha tkun imneħħija, meta prattikabbli, bl-użu ta' ilma jew b'xi solvent xieraq mingħajr ma jbiddel ir-reazzjoni eżistenti jew l-integrità ta' l-epidermis.

1.4.2.2 *Livell tad-doża*

Doża ta' 0,5 ml likwidu jew 0,5 g solidu jew dlik hija applikata mażżona tat-test.

1.4.2.3 *It-test inizjali (It-test in vivo bl-irritazzjoni/korrożjoni dermali bl-użu ta' annimal wieħed)*

Huwa ferm rakkommandabbli li t-test *in vivo* jkun imwettaq inizjalment bl-użu ta' annimal wieħed, speċjalment meta s-sustanza tkun issusspetata li jkollha potenzal korrossiv. Dan huwa skond l-istrateġija tat-testijiet sekwenzali (ara l-Anness 1).

Meta sustanza tkun ġiet iġġudikata bħala korrossiva fuq il-bażi ta' l-analiżi ta' l-evidenza peżata, l-ebda aktar testijiet fuq l-annimali ma jkunu meħtieġa. Għal bosta mis-sustanzi li huma issusspettati bħala korrossivi, aktar testijiet *in vivo* ma jkunux normalment meħtieġa. B'dana kollu, f'dawk il-każi meta informazzjoni addizzjonali tinħass li tkun meħtieġa minħabba l-evidenza mhux suffiċjenti, testijiet limitati ta' l-annimali jistgħu jitwettqu bl-użu ta' dan il-metodu: Sa tlett biċċiet tat-test huma applikati b'mod sekwenzali fuq l-annimal. L-ewwel biċċa tkun imneħħija wara tlett minuti. Jekk l-ebda reazzjoni tal-ġilda ma tkun osservata, it-tieni biċċa tkun applikata u mneħħija wara siegħa. Jekk l-osservazzjonijiet f'dan l-istadju jindikaw li l-espożizzjoni tista' titħalla b'mod umanitarju, allura t-test ikun estiż għal erba' siegħat, it-tielet biċċa tkun applikata u mneħħija wara erba' siegħat, u r-reazzjoni tkun gradata.

Jekk effett korrossiv ikun osservat wara kwalunkwe mit-tlett espżizzjonijiet sekwenzali, it-test ikun immedjetament terminat. Jekk effett korrossiv ma jkunx osservat wara li l-aħħar biċċa tkun imneħħija, l-annimal ikun osservat għal 14-il jum, sakemm il-korrożjoni ma tkunx żviluppat f'xi punt aktar kmieni.

▼B

F'dawk il-każi li fihom is-sustanza tat-test ma tkunx mistennija li tipproduċi korrożjoni imma li tista' tkun irritanti, biċċa waħda għandha tkun applikata ma annimal wieħed għal erba' siegħat.

1.4.2.4 *Test konfermatorju (It-test in vivo ta' l-irritazzjoni tal-ġilda b'annimali addizzjonali)*

Jekk effett korrossiv ma jkunx osservat fit-test inizjali, l-irritant jew ir-reazzjoni negattiva għandhom ikunu ikkonfermati bl-użu ta' żewġ annimali oħrajn, kull wieħed b'biċċa waħda, għal perjodu ta' espożizzjoni ta' erba' siegħat. Jekk effett irritanti jkun osservat fit-test inizjali, it-test konfermatorju jista' jitwettaq b'mod sekwenzali, jew bl-espożizzjoni ta' żewġ annimali simultanjament. Fil-każ eċċezzjoni, li fih it-test inizjali ma jkunx imwettaq, tnejn jew tlett annimali jistgħu ikunu ittrattati b'biċċa waħda, li tkun imneħħija wara erba' siegħat. Meta żewġ annimali huma użati, jekk it-tnejn li huma juru l-istess reazzjoni, l-ebda testijiet oħrajn ma huma meħtieġa. Inkella, it-tielet annimal ikun ukoll ittestjat. Reazzjonijiet ekwoviċi ikunu jeħtieġu avalwazzjoni bl-użu ta' annimali addizzjonali.

1.4.2.5 *Perijodu ta' osservazzjoni*

It-tul ta' żmien ta' l-istudju għandu jkun suffiċjenti sabiex tkun evalwata r-riversabbiltà jew in-nuqqas ta' riversabbiltà ta' l-effetti osservati. B'dana kollu l-esperiment għandu jkun terminat fi kwalunkwe ħin jekk dak l-annimal ikollu sinjali kontinwi ta' uġiegħ jew tbagħtija qawwija. Sabiex ikunu determinati l-effetti tar-riversabbilità, l-annimali għandhom ikunu osservati sa 14-il jum wara t-tneħħija tal-biċċiet. Jekk l-irriversibbiltà tkun osservata qabel l-14-il jum, l-esperiment għandu jkun imwaqqaf f'dak il-waqt.

1.4.2.6 *Osservazzjonijiet kliniċi u l-iggradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda*

L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għal sinjali ta' eritema u odema, u r-reazzjoni rreġistrati wara 60 minuta, u imbagħad fi 24, 48 u 72 siegħa, wara t-tneħħija tal-biċċa. Għattest inizjali fuq annimal wieħed, is-sit tat-test ikun ukoll eżaminat immedjetament wara li l-biċċ tkun imneħħija. Ir-reazzjoni dermali huma ggradati u rreġistrati skond il-gradi fit-tabella ta' hawn taħt. Jekk ikun hemm ħsara għall-ġilda li ma tistgħax tkunidentifikata bħala irritazzjoni jew korrożjoni wara 72 siegħa, l-osservazzjonijiet jistgħu ikunu meħtieġa sal-jum 14 sabiex tkun determinata r-riversibbiltà ta' l-effetti. B'żieda ma l-osservazzjonijiet ta' l-irritazzjoni, l-effetti tossiċi kollha, bħal ma huma n-nuqqas ta' xaħam min taħt il-ġilda, u xi effett kuntrarji sistematiċi (eż. l-effetti fuq sinjali kliniċi ta' tossiċità u l-piż tal-ġisem), għandhom ikunu deskritti bis-sħiħ u rreġistrati. L-eżaminazzjoni ħistoġatoloġika għandha tkun ikkonsidrata sabiex tikklarifika r-reazzjonijiet b'mod ekwivoku.

Il-gradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda hija neċċessarjament suġġestiva. Sabiex tkun imħġeġġa l-armonizzazzjoni fil-gradar tar-reazzjoni tal-ġilda u sabiex ikunu mgħejjuna l-laboratorji tat-testijiet u dawk involuti fiż-żamma ta' l-osservazzjonijiet u ta' l-interpretazzjoni tagħhom, il-persunal li jwettaq l-osservazzjonijiet jeħtieġu li jkunu adekwatament imħarrġa fis-sistema ta' l-iggradat kif użata (ara t-Tabella ta' hawn taħt). Gwida illustrata dwar l-iggradar ta' l-irritazzjoni tal-ġilda u feriti oħrajn tista' tkun ta' għajnuna (9).

2. **DATA**

2.1 PREŻENTAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Ir-riżultati ta' l-istudju għandhom ikunu miġbura f'sommarju f'għamla tabulari fir-rapport finali tat-test u għandhom ikopru l-punti kollha elenkati fis-sezzjoni 3.1.

▼B

2.2 EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Il-marki ta' l-irritazzjoni dermali għandhom ikunu evalwati b'konnessjoni man-natura u s-severità tal-feriti, u r-riversibbilità tagħhom, jew tan-nuqqas ta' riversibbilità. Il-marki individwali ma jkunux jirrapreżentaw norma assoluta għall-propjetajiet irritanti ta' xi materjaa, minħabba li effetti oħrajn tal-materjal taat-test huma wkoll evalwati. Minflok, marki individwali għandhom ikunu meqjusa bħala valuri ta' referenza, li jeħtieġu li jkunu evalwati flimkien ma l-osservazzjonijiet l-oħrajn kolha li jirriżultaaw mill-istudju.

Ir-riversibbilità tal-feriti dermali għandha wkoll tkun ikkunsidrata fl-evalwazzjoni tar-reazzjoni irritanti. Meta r-reazzjonijiet bħal ma huma l-alopeċja (żoma limitat), iperkeratożi, iperplażja u qxur, jippersistu fit-tmiem talk-perjodu ta' 14-il jum osservazzjoni, is-sustanza tat-test għandha tkun meqjusha bħala irritanti.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1 RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Raġġunar dwar it-test in *vivo*: Analiżi ta' l-evidenza mal-piż ra' informazzjoni pre-eżistenti qabel it-test, inklużi r-riżultati minn strateġija ta' testijiet sekwenzali:

— deskrizzjoni tad-dettalji relevanti disponibbli minn testijiet preċedenti;

— informazzjoni akkwistat f'kull stadju ta' l-istrateġija ta' l-ittestjar;

— deskrizzjoni tat-testijiet in *vitro* kif imwettqa, inklużi d-dettalji tal-proċeduri, ir-riżultati akkwistati bis-sustanza tat-test/referenza;

— analiżi ta' l-evidenza peżata għat-twettieq ta' l-istudju *in vivo.*

Is-sustanza tat-test:

— dettalji ta' l-identifikazzjoni (eż. numru CAS; sorsi; purità; impuritajiet magħrufa; n-numru tal-lot);

— in-natura fiżika u l-propjetajiet fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, solubilità, stabbilità);

— jekk taħlita, il-komposizzjoni u l-persentaġġi relattivi tal-komponenti.

Mezz:

— l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (meta xieraq), il-volum użat;

— il-ġustifikazzjoni tal-mezz użat.

Annimali tat-test:

— l-ispeċji/tipi użati, ir-raġjunar għall-użu ta' l-annimali apparti milli fniek albino;

— in-numru ta' l-annimaali għal kull sess;

— il-piżijiet ta' l-annimali individwali, kemm fil-bidu u wkoll fil-konklużjoni tat-test;

— l-età fil-bidu ta' l-istudju;

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, eċċ.

▼B

Kundizzjonijiet tat-test:

— it-teknika taal-preparazzjoni tas-sit tal-biċċa;

— id-dettalji tal-materjali użat fil-biċċa u t-teknika tat-twaħħil tal-biċċa;

— dettalji dwar il-preparazzjoni, l-applikazzjoni u t-tneħħija tas-susstanza tat-test.

Riżultati:

— tabulazzjoni tal-marki tar-reazzjoni/korrożjoni għal kull annimal fil-punti kollha tal-ħin tal-kejl;

— deskrizzjonijiet tal-feriti kollha, kif osservati;

— deskrizzjoni narrattiva tan-natura u l-grad ta' l-irritazzjoni jew tal-korrożjoni osservati, u xi sejbiet ħistopatoloġiċi;

— id-deskrizzjoni ta' xi Danni lokali oħrajn (eż. tneħħija tax-xaħam minn taħt il-ġilda) u l-effetti sistematiċi b'żieda ma l-irritazzjoni jew il-korrożjoni dermali.

— Diskussjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In vitro*, 2, 19-26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). 1. L-istudju ECVAM tal-validazzjoni internazzjonali dwar testijiet *in vitro* għall-korrossività tal-ġilda. 2. Ir-riżultati u l-evalwazzjoni mill-Grupp Amministrattiv Toxicology *in vitro* 12, pp. 483-524.

(5a) Metodu tat-test B.40, Korrożjoni tal-Ġilda

(6) Programm ta' Linji ta' Gwida għat-Test OECD (1996): Rapport Finali tal-Grupp ta' Studju OECD dwar l-Armonizzazzjoni tal-Validazzjoni u l-Aċċettazzjoni tal-Kriterja dwar Metodi Alternattivi għal-Testijiet Tossikoloġiċi. Li kien inżamm fi Solna, l-Isvezjam fit-22 – 24 ta' Jannar 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998), Is-Sistema tal-Klassifika Integrata Armonizzata tal-Perikoli għas-Saħħa Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kumiċi, kif approvat mit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat tal-Kimika u tal-Grupp ta' Ħidma dwart il-Kimika, Novembru 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Dokument ta' Gwida dwar ir-Rikonoxximent, l-Assessjar u l-Użu ta' Sinjali Kliniċi bħala għanijiet finali umanitarji għall-annimali Sperimenti Użati fl-Evalwazzjoni tas-Sigurtà. OECD, Pubblikazzjonijiet dwar is-Saħħa u s-Sigurtà Ambjentali. Serje dwar it-Testijiet u l-Assessjar Nru. 19 (http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas tal-Feriti Dermali, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

(Disponibbli ma talba minn għand is-Segretarjat ta' l-OECD).

▼B

Tabella I

IGGRADAR TAR-REAZZJONIJIET TAL-ĠILDA

Il-Formazzjoni ta' l-Eritema u l-Eskar

L-ebda eritema	0
Eritema ferm ħafifa (bill-kemm tidher)	1
Eritema definita sewwa	2
Eritima moderata jew severa	3
Eritema severa (ħmura ta' laħam nej) għall-formazzjoni ta' l-eskar għall-prevenzjoni ta' l-eritema gradata	4

Massimu possibli: 4

Formazzjoni ta' l-odema

L-ebda oredma	0
Odema ferm ħafifa (bill-kemm tidher)	1
Odema ħafifa (it-trufijiet taż-żona definiti sewwa b'ħanek definit)	2
Odema moderata (imqabbża b'madwar 1 mm)	3
Odema severa (imqabbża b'aktar minn 1 mm u testendi lil hinn miż-żona esposta)	4

Massimu possibli: 4

L-eżaminazzjoni ħistoġatoloġika għandha titwettaq sabiex tikklarifika r-reazzjonijiet b'mod ekwoviku.

▼B

ANNESS

Strateġija ta' testijiet Sekwenzali dwar l-Irritazzjoni u l-Korrożjoni ta' l-Għajnejn

KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI

Fl-imnteressi ta' xjenza soda u l-ġid ta' l-annimali, huwa importanti li jkun evitat l-użu bla bżonn ta' l-annimali, u jkun imnaqqas it-testjar li aktar jipproduċi reazzjonijiet serveri fl-annimali. L-informazzjoni kollha dwar sustanza relatata mal-potenzal tagħha ta' l-irritazzjoni/korrożjoni okulari għandha tkun evalwata bil-quddiem qabel ma jkunu ikkonsidrati t-testijiet *in vivo*. Evidenza suffiċjenti tista' tkun diġa teżisti sabiex tikklassifika sustanza tat-test dwar l-irritazzjoni ta' l-għajnejn jew tal-potenzal tal-korrożjoni mingħajr il-ħtieġa li jkunu mwettqa testijiet fuq l-annimali tal-laboratorju. Għalhekk, l-utiliżżażżjoni ta' l-analiżi pożata bl-evidenza u l-istrateġija sussegwenti tat-testijiet għandha tnaqqas il-ħtieġa ta' testijiet *in vivo*, speċjalemnt jekk is-sustanza aktarx li tipproduċi reazzjonijiet severi.

Huwa rakkommandabbli li l-analiżi ta' l-evidenza pożata tkun użata għall-evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti li tappartieni għas-sustanzi ta' l-irritazzjoni u l-korrożjoni ta' l-għajnejn u sabiex tiddetermina jekk studju addizzjonali, apparti milli l-istudji *in vivo* fuq l-għajnejn, għandhom ikun u mwettqa sabiex jgħinu dwar il-karatteristiċi ta' tali potenzal. Meta aktar studji huma meħtieġa, huwa rakkommandabbli li l-istrateġija ta' testijiet sekwenzali tkun utilizzata sabie tiżviluppa d-dettalji sperimentali relevanti. Għal sustanzi li ma jkollhom l-ebda storja ta' testijiet, l-istrateġija tat-testijiet sekwenzali għandha tkun utilizzata sabiex jiżviluppa l-informazzjoni meħtieġa għall-evalwazzjoni tal-korrożjoni/-irritazzjoni tagħha fuq l-għajnejn. L-istrateġija tat-testijiet deskritta f'dan l-Anness kienet ġiet żviluppata minn grupp ta' ħidma tal-OECD (1). Kienet sussegwentament ikkonfermata u mkabbra fis-sistema tal-Klassifa Armonizzata Integrata dwar is-Saħħa Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kimiċi, kif ikkonfermata bit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat tal-Kimiċi u tal-Grupp ta' Ħidma dwar il-Kimiċi, f'Novembru 1998 (2).

Għalkemm din l-istrateġija tat-testijiet mhix parti integrali tal-metodu tat-testijiet B.5, din tesprimi r-resqien rakkommandat għad-determinazzjoni tal-propjetajiet ta' l-irritazzjoni/korrożjoni ta' l-għajnejn. Dan ir-resqien jirrapreżenta kemm l-aħjar prassi u l-mira etika dwar testijiet *in vivo* ta' l-irritazzjoni korrożjoni ta' l-għajnejn. Il-metodu tat-testijiet jipprovdi gwida għat-twettieq tat-test *in vivo* u sommarji u fatturi li għandhom ikunu ndirizzati qabel ma jkun ikkonsidrat tali test. L-istrateġija tat-testijiet sekwenzali tipprovdi r-resqien ta' l-evidenza pożata għall-evalwazzjoni ta' informazzjoni eżistenti dwar il-propjetajiet ta' l-irritazzjoni/kjorrożjoni ta' l-għajnejn, ta'sustanza, u tar-resqien imtarraġ għall-ġenerazzjoni ta' l-informazzjoni relevanti dwar sustanzi li dwarhom studju addizzjonali huma meħtieġa jew li dwarhom l-ebda studji ma kienu twettqu. L-istrateġija tinkludi it-twettieq, l-ewwel ta' testijiet tal-validazzjoni u l-aċċettazzjoni *in vitro* jew *ex vivo*, u imbagħad il-metodu tat-test B.4 ta' studji dwar l-irritazzjoni/korrożjoni tal-ġilda skond iċ-ċirkostanzi speċifiċi (3) (4).

DESKRIZZJONI TA' L-ISTRATEĠIJA GĦAL TESTIJIET PASS B'PASS

Qabel ma jitwettqu t-testijiet bħala parti mill-istrateġija tat-testijiet sekwenżjali (il-Figura), l-informazzjoni disponibbli kollha għandha tkun evalutata għad-determinazzjoni tal-ħtieġa tat-testijiet *in vivo* fuq l-għajnejn. Għalkemm informazzjoni sinifikanti tista' tkun akkwistata mill-evalwazzjoni ta' parametri singoli (eż. pH estrema), it-totalità ta' l-informazzjoni eżistenti għandha tkun assessjata. L-informazzjoni relevanti kollha dwar l-effetti tas-sustanza f'dak il-każ, u ta' l-analogi strutturali tagħha, għandhom ikunu evalutati fit-teħid tad-deċiżjoni ta' l-evidenza pożata, u r-raġjunar għad-deċiżjoni għandu jkun ippreżentat. L-emfasi primarja għandha tkun fuq l-informazzjoni jmana u ta' l-annimali eżistenti risward is-sustanza, segwita bl-eżitu tat-testijiet *in vitro* jew *ex vivo*. L-istudji *in vivo* ta' sustanzi korrosivi għandhom ikunu evitati, kull meta jkun possibbli. Il-fatturi meqjusa għall-istrateġija tat-testijiet, jinkludu:

▼B

Evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti, umana u ta' l-annimali (il-Pass 1). Informazzjoni eżistenti umana, eż. studji kliniċi u okkupazzjonali, u rapporti dwar il-każ, u/jew informazzjoni minn testijiet fuq l-annimali minn studji okulari għandhom ikun ikkunsidrata bħala l-ewwel ħaġa, minħabba li dawn jipprovdu informazzjoni relatata direttament ma l-effetti fuq l-għajnejn. Wara dan, l-informazzjoni disponibbli mill-istudji umani u/jew ta' l-annimali, li jinvestigaw korrożjoni/irritazzjoni dermali, għandhom ikunu evalutati. Sustanzi b'korrossività magħrufa jew ta' irritazzjoni severa, fuq l-għajnejn, m'għandhomx ikunu imdeffsa fuq l-għajnejn ta' l-annimali, u l-anqas m'għandhom is-sustanzi li juru effetti korrossivi jew irritanti fuq il-ġilda; tali sustanzi għandhom ikunu meqjusa bħala korrossivi u/jew irritanti għall-għajnejn, ukoll. Sustanzi b'evidenza suffiċjenti ta' non-korrossività u non-irritazzjoni, minn studji okulari preċedenti diġa mwettqa, għandhom ukoll ma jkunux ittestjati fi studji *in vivo* fuq l-għajnejn.

Analiżi tar-relazzjonijietta' l-attività strutturali (SAR) (il-Pass 2). Ir-riżultati tat-testijiet ta' kimika strutturalment relatata għandhom ikunu ikkunsidrati, jekk disponibbli. Meta informazzjoni, umana u/jew ta' l-annimali, suffiċjenti, tkun disponibbli dwar sustanzi jew taħlitiet strutturalment relatati ta' tali sustanzi li jindikaw il-potenzal tal-korrożjoni/irristazzjoni ta' l-għajnejn, dan għandu jkun present li s-sustanza tat-test tkun sejra tipproduċi l-istess reazzjonijiet. F'dawk il-każi, is-sustanza ma jkunx hemm ħtieġa tat-test tagħha. Informazzjoni negattiva mill-istudji tas-sustanzi strutturalment relatati jew minn taħlitiet ta' tali sustanzi ma tkunx tikkostitwixxi evidenża suffiċjenti tan-non-korrosività/non-irrittabbilità ta' sustanza permezz ta' l-istrateġija tat-testijiet sekwenzali. Ir-resqien SAR validat u aċċettat għandu jkun użat sabiex jidentifika l-korrożjoni u l-irrirtazzjoni potenzali kemm ta' l-effett dermali u wkoll okulari.

Propjetajiet fiżikokimiċi u r-reattivazzjoni kimika (il-Passa 3). Is-sustanzi li jesebixxu pH estremi bħal ma huma ≤ 2,0 jew ≥ 11,5 jistgħu ikollhom effetti lokali ferm qawwija. Jekk il-pH estrema hija l-bażi għall-identifikazzjoni ta' sustanza bħala korrossiva jew irritanti għall-għajnejn, allura ir-riserva aċida/-alkalina tagħha (il-kapaċità mewwieta) tista' wkoll tkun ikkunsidrata (5) (6). Jekk il-kapaċità mewwieta tissuġġerixxi lki sustanza ma tistgħax tkun korrossiva għall-għajnejn, allura aktar testijiet għandhom ikunu mwettqa sabiex jikkonfermaw dan, preferibbilment bl-użu ta' test *in vitro* jew *ex vivo* validat u aċċettat (ara s-sezzjoni, il-pass 5 u 6).

Konsiderazzjoni ta' informazzjoni eżistenti oħra (il-Pass 4). L-informazzjoni disponibbli kollha dwar it-tossiċità sistematika permezz tar-rotta dermali għandha tkun evalutata f'dan l-istadju. It-tossiċità dermali akuta tas-sustanza tat-test għandha wkoll tkun ikkonsidrata. Jekk is-susrtanza tat-test tkun uriet li hija ferm tossika bir-rotta dermali, din ma tkunx teħtieġ li tkun ittestjata fl-għajnejn. Għalkemm mhux bilfors li neċessarjament hemm relazzjoni bejn it-tossiċità akuta dermali u l-irritazzjoni/korrożjonu ta' l-għajnejn, dan jista' jkun preżent jekk aġent li huwa ferm tossiku via ir-rotta dermali, dan ikun ukoll jesebixxi tossiċità għolja meta jkun imqiegħed fuq l-għajnejn. Tali informazzjoni tista' wkoll tkun ikkonsidrata bejn il-Passi 2 u 3.

Ir-riżultati mit-testijiet in vitro jew ex vivo (il-Passi 5 u 6). Is-sustanzi li jkunu wrew propjetajiet severi korrossivi jew irritanti f'test in *vitro* jew *ex vivo* (7) (8) li jkunu ġew validati u aċċettati għall-istudju speċifikament dwar il-kossossività/-irritazzjoni ta' l-għajnejn jew tal-ġilda, ma jeħtieġx li jkunu ittestjati fuq l-annimali. Jista' jkun preżent li tali sustanzi jkunu jipproduċu l-istess effetti severi *in vivo*. Jekk it-testijiet *in vitro*/*ex vivo* validati u aċċettati ma jkunux disponibbli, wieħed għandu jevita il-Passi 5 u 6 u jipproċiedi direttament għall-Pass 7.

Assessjar ta' l-irritazzjoni jew tal-korrożjoni dermali in vivo tas-sustanza (il-Pass 7). Meta evidenza mhux suffiċjenti tkun teżisti li permezz tagħha tista' titwettaq analiżi konklussiva ta' l-evidenza peżata tal-potenzal ta' l-irritazzjoni/korrossività ta' l-għajnejn minn sustanza, li tkun ibbażata fuq inforazzjoni mill-istudji elenkati hawn fuq, il-potenzal ta' l-irritazzjoni/korrożjoni *in vivo* għandha l-ewwel tkun evalutata, bl-użu tal-metodu B.4 (4) u ta' l-Anness li hemm miegħu (9). Jekk is-sustanza turi li tipproduċi korrożjoni jew irritazzjoni severa tal-ġilda, din għandha tkun ikkunsidrata bħala li hija irritant korrossiv għall-għajnejn sakemm infomazzjoni oħra tkun tappoġġja konklużjoni alternattiva. B'hekk, it-test *in vivo* fuq l-għajnejn ma jkunx hemm ħtieġa li jitwettaq. Jekk is-sustanza ma tkunx korrossiva jew severament irritanti għall-ġilda, it-test *in vivo* fuq l-għajnejn jenħtieġ li jkun imwettaq.

▼B

Test in vivo fuq il-fniek (il-Passi 8 u 9): Testijiet okulari *in vivo* għandhom ikunu mibdija b'test inizjali li juża annimali wieħed. Jekk ir-riżultati ta' dan it-test jindikaw li s-sustanza tkun severament irritanti jew korrosiva għall-għajnejn, aktar testiet ma jkunx meħtieġa. Jekk dak it-test ma jiżvelax xi effetti korrossivi jew severi, test konfermatorju ikun imwettaq b'żewġ annimali oħrajn.

REFERENZI

(1) Programm ta' Linji ta' Gwida għat-Test OECD (1996): Rapport Finali tal-Grupp ta' Studju OECD dwar l-Armonizzazzjoni tal-Validazzjoni u l-Aċċettazzjoni tal-Kriterja dwar Metodi Alternattivi għal-Testijiet Tossikoloġiċi. Li inżamm fi Solna, l-Isvezja, 22-24 ta' Jannar 1996. (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998), Is-Sistema tal-Klassifika Integrata Armonizzata tal-Perikoli għas-Saħħa Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kumiċi, kif approvat mit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat tal-Kimika u tal-Grupp ta' Ħidma dwart il-Kimika, Novembru 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Metodu tat-testijiet B.4. Tossiċità akuta: Irritazzjoni/korrużjoni dermali.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In vitro*, 2, 19-26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) L-istudju ta' validazzjoni internazzjonali ECVAM dwar it-testijiet *in vitro* għall-korrossività tal-ġilda. 2. Ir-riżultati u l-evalwazzjoni mill-Grupp Amministrattiv Toxicology *in vitro* 12, pp. 483–524.

▼B

Figura

STRATEĠIJA GĦAT-TESTIJIET U L-EVELWAZZJONI LA' L-IRRITAZZJONI/KORROŻJONI DERMALI

	Attività	Sejbiet	Kontlu'joni
1	Informazzjoni umana u/jew mill-annimali eżistenti li turi l-effetti fuq il-ġilda jew fuq il-membrani mukkużi	Korrossiva	Għan finali atipiku; meqjusha bħala korrossiva. L-ebda test m'hu meħtieġ Għan finali atipiku; meqjusha bħala korrossiva. L-ebda test m'hu meħtieġ.
		Irritanti	Għan finali atipiku; meqjusha bħala mhux korrossiva jew irritanti. L-ebda test m'hu meħtieġ. L-ebda test m'hu meħtieġ.
		Mhux korrossiva / mhux irritanti	Għan finali atipiku; meqjusha bħala mhux korrossiva jew irratanti. L-ebda test m'hu meħtieġ.
	↓		
	L-ebda informazzjoni ma hija disponibbli jew l-informazzjoni disponibbli mhix konklussiva		
	↓		
2	Wettaq evalwazzjoni SAR dwar il-korrossività/irritazzjoni tal-ġilda	Hsara severa hi mbassra għall-ġilda	Meqjusha korrossiva. L-ebda test m'hu meħtieġ
		Irritazzjoni hija mbassra għall-ġilda	Meqjusha korrossiva. L-ebda test m'hu meħtieġ.
	↓		
	L-ebda previżjonijiet ma jistgħu isiru, jew il-previżjonijiet huma mhux-konklussivi jew negattivi		
	↓		
3	Miżura pH (ikkunsidra l-kapaċità mewwieta, jekk relevanti)	pH ≤ 2 jew ≥ 11,5 b'kapaċità mewwieta, jekk relevanti	Assumi l-korrossività. L-ebda test m'hu meħtieġ.
	↓		
	2 < pH < 11,5, jew pH ≤ 2 jew pH ≥ 11,5 b'kapaċita mewwieta baxxa / jew mingħajra, jekk relevanti		
	↓		
4	Evalwazzjoni sistematika ta' l-informazzjoni tossikoloġika via ir-rolw dermali (1)	Ferm tossika	L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ.
		Mhux korrossiva jew irritanti meta tkun ittestjata sal-limitu tad-doza ta' 2000 mg/kg piż tal-ġisem jew għola, bl-użu tal-fniek	Assumi l-korrossività jew l-irritazzjoni. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ.
	↓		
	Tali informazzjoni m'hiex disponibbli jew l-informazzjoni disponibbli mhix konklussiva		
	↓		
5	Wettaq test validat u aċċettat, *in vitro* jew *ex vivo* dwar i]-korrożjoni tal-ġilda	Reazzjoni korrossiva	Assurni l-korrossività *in vivo*. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ.
	↓		
	Sustanza mhux korrossiva		
	↓		
6	Wettaq test validat u aċċettat, *in vitro* jew *ex vivo* dwar il-korrożjoni tal-ġilda	Reazzjoni irritanti	Assumi irritazzjoni *in vivo*. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ.
	↓		
	Metodi tat-testijiet tal-validazzjoni in vitro *jew* ex vivo *għall-irritazzjoni tal-ġilda għadhom mhux disponibbli jew is- sustanzi mhix irritanti*		
	↓		
7	Wettaq test inizjali *in vivo* fuq il-fniek bl-użu ta' animal wiehed.	Hsara severa għall-ġikla	Meqjusha korrossiva. L-ebda test ieħor m'hu meħtieg
	↓		
	L-enda hsara severa		
	↓		
8	Wettaq test konfermatorju bl-użu ta' wiehed jew tnejn annimali addizzjonali	Korrossiva jew irritanti	Meqjusha korrossiva jew irritanti. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ
		Mhux korrossiva / mhux irritanti	hux meqjusha korrossiva jew irritanti. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ

(1) Tista tikun ikkunsidrata qabel il-Passi 2 u 3.

▼B

B.5. TOSSIĊITÀ AKUTA: IRRITAZZJONI/KORRUŻJONI TA' L-GĦAJNEJN

1. METODU

Dan il-metodu huwa ekwivalnti għal OECD TG 405 (2002)

1.1 INTRODUZZJONI

Fil-preparazzjoni ta' dan il-metodu aġġornat, attenzjoni speċjali kienet mogħtija għat-titjib possibbli b'relazzjoni ma dak li jikkonċerna l-ġid ta' l-annimali u ta' l-evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti kollha dwar is-sustanza tat-test sabiex ikunu evitati testijiet mingħajr ħtieġa ta' l-annimali fil-laboratorju. Dan il-metodu jinkludi r-rakkommandazzjonijiet li qabel ma jibda l-impenn deskritt għat-est *in vivo* dwar il-korrużjoni/irritazzjoni tas-sustanza, l-analiżi ta' l-evidenza peżata għandu jkun imwettaq (1) skond id-dettalji relevanti eżistenti. Meta d-disponabbiltà ta' dettalji mhux suffiċċjenti, dawn jistgħu ikunu żviluppati permezz ta' l-applikazzjoni ta' testijiet sekwenzali (2)(3). L-istrateġija tat-testijiet tinkludi it-twettieq ta' testijiet validati u aċċettabbli ta' *in vitro* u kemm provvediment dwarha bħala Anness ta' dan il-metodu. B'żieda, l-użu tat-test *in vivo* ta' l-irritazzjoni/korrużjoni dermali, sabiex ikun hemm tbassir tal-korrużjoni ta' l-għajnejn qabel il–kunsiderazzjoni tat-test *in vivo* ta' l-għajnejn, huwa rakkommandabbli.

Fl-interess kemm ta' xjenza għaqlija u tal-ġid ta' l-annimali, testijiet *in vivo* m'għandhomx iseħħu qabel ma d-dettalji relevanti disponibbli kollha dwar il-potenzal ta' korrossività/irritazzjoni tal-ġilda mis-sustanza jkunu ġew evalwati b'analiżi tal-peżar bl-evidenza. Tali dettalji għandhom jinkludu evidenza minn studju eżistenti kemm fuq il-bnedmin u/jew l-annimali tal-laboratorju, l-evidenza ta' korrossività/irritazzjoni ta' sustanza waħda struttarament relatati u it-taħlitiet ta' tali sustanzi, id-dettalji li juru aċidità jew alkalinità qawwija tas-sustanza (4) (5), u r-riżultati minn testijiet validati u aċċettati kemm *in vitro* jew *ex vivo* (6) (6a). L-istudji setgħu kienu ġew imwettqa preċedentament għal, jew bħala riżultat ta', l-analiżi ta' l-evidenza peżata.

Għal-ċerti sustanzi, tali analiżi tista' tindika l-ħtieġa għal studji *in vivo* dwar il-potenzal tas-sustanza għal korrożjoni/irritazzjoni okulari. F'tali każi, qabel ma jkun ikkunsidrat l-użu tat-test *in vivo* fuq l-għajnejn, studju preferibbilemt *in vivo* ta' l-effetti dermali mis-sustanza għandu jkun l-ewwel nett imwettaq u evalwat bi qbil mal-metodu tat-testijiet B.4 (7). L-applikazzjoni ta' l-analiżi ta' l-evidenża peżata u ta' l-istrateġija sekwenzali tat-testijiet għandhom inaqqsu l-ħtieġa tat-testijiet *in vivo* dwar il-korrossività/irritazzjoni ta' l-għajnejn mis-sustanza li dwarha evidenza suffiċjenti tkun diġa teżisti minn studju oħrajn. Jekk id-determinazzjoni tal-potenzal tal-korrożjoni jew l-irritazzjoni ta' l-għajnejn ma tistgħax issir bl-istrateġija tat-testijier sekwenzali, anki wara t-twettieq ta' studju *in vivo* tal-korrożjoni u l-irritazzjoni dermali, test in *vivo* tal-korrożjoni/-irritazzjoni ta' l-għajnejn jista' jkun imwettaq.

▼B

Strateġija preferuta sekwenzali ta' testijiet, li tinkludi t-twettieq ta' testijiet validati u aċċettabbli, *in vitro* jew *ex vivo*, dwar il-korrożjoni/irritazzjoni, hija inkluża bħala Anness għal dan il-metodu. L-istrateġija kienet żviluppata fi, u rakkommandata b'mod unanimu, mill-parteċipanti ta' laqgħa ta' studju ta' l-OECD (8), u kienet ġiet adottata bħala l-istrateġija rakkommandata tat-testijiet fis-Sistema Armonizzata Globali għall-Klassifika ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) (9). Huwa rakkommandabbli li din l-istrateġija tat-testijiet tkun segwita qabel ma jindew xi testijiet *in vivo*. Għal sustanzi ġodda huwa rakkommandabbli r-resqien ta' testijiet pass b'pass għall-iżvilupp ta' informazzjoni xjentifikament soda dwar il-korrosività/irritazzjoni mis-sustanza. Għal sustanzi eżistenti b'informazzjoni mhux suffiċjenti dwar il-korrożjoni/irritazzjoni tal-ġilda, l-istrateġija għanha tkun użata sabiex timla l-vojt fin-nuqqas tad-dettalji. L-użu ta' strateġija jew proċedura differenti tat-testijiet, jew ta' deċiżjoni li ma jkunx utilizzat it-test ta' pass b'pass, għandha tkun ġustifikata.

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Irritazzjoni għal għajnejn: Hija l-produzzjoni ta' tibdiliet fil-għajnejn b'segwiment ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test mal-part esterna ta' l-għajn, li huma kompletament riversibbli xi żmien 21 jum mill-applikazzjoni.

Korrożjoni ta' l-għajnejn: Hija l-produzzjoni ta' tibdiliet fil-għajnejn b'segwiment ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test mal-part esterna ta' l-għajn, li huma kompletament riversibbli xi żmien 21 jum mill-applikazzjoni.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test hija applikata f'doża singola ma waħda mill-għajnejn ta' l-annimal tal-prova; l-għajn mhux trattata isservi bħala kontroll. Il-grad ta' l-irritazzjoni/korrożjoni ta' l-għajn huwa evalwat billi jkunu immarkati l-feriti ta' konġunktiva, l-kornea, u l-iris, matul intervalli speċifiċi. Effetti oħrajn fil-għajn u l-effetti kuntrarji sistematiċi huma wkoll deskritti sabiex jipprovdu evalwazzjoni sħiħa ta' l-effetti. It-tul ta' żmien ta' l-istudju għandu jkun suffiċjenti sabiex tkun evalwata r-riversabbilità jew in-nuqqas ta' riversabbilità ta' l-effetti osservati.

L-annimali li juru sinjali kontinwi ta' dwejjaq u/jew uġiegħ severi, fi kwalunkwe waqt tat-test, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju, u s-sustanza tkun assessjata kif xieraq. Il-kriterja sabiex tittieħed id-deċiżjoni li jkunu maqtula b'mod umanitarju l-annimali moribondi jew li jkunu jsofru ħafna tista' tinstgħab fir-referenza (10).

1.4 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **Preparazzjoni tat-test *in vivo***

1.4.1.1 *L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali*

Il-fenek albino huwa l-annimal preferut tal-laboratorju, u fniek żgħażagħ adulti huma użati. Ir-raġuni għall-użu ta' speċje oħrajn għandha tkun mogħtija.

1.4.1.2 *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Iż-żewġ għajnejn ta' kull annumal sperimentali proviżjonalment magħżul għat-testijiet għandu jkun eżaminat fi żmien 24 siegħa qabel ma jibda t-test. L-annimali li juru irritazzjoni fl-għajnejn, difetti okulari, jew li ħsara korneali pre-eżistenti m'għandhomx ikunu użati.

▼B

1.4.1.3 *Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf*

L-annimali għandhom jinzammi f'gaġġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 20 ºC (± 3 ºC), għall-fniek. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

1.4.2 **Proċedura tat-test**

1.4.2.1 *L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test*

Is-sustanza tat-test għandha tkun imqiegħda fuq il-ħofra konġunktivali ta' waħda mill-għajnejn ta' kull annimal wara li l-għatu tan-naħa t'isfel ta' l-għajn ikun inġibed lil himm mill-boċċa ta' l-għajn. Il-għotjien jkunu imbagħad b'ġentilezza miżmuma flimkien għal madwar sekonda sabiex ikun prevenut it-telf tal-materjal. L-għajn l-oħra, li tibqa mingħajr trattament, isservi bħala kontroll.

1.4.2.2 *Irrigazzjoni*

L-għajnejn ta' l-annimali tat-test m'għandhomx ikunu maħsula għal mill-anqas 24 siegħa wara li tkun saret l-istallazzjoni tas-sustanza tat-test, apparti milli fil-każ ta' solidi (ara s-sezzjoni 1.4.2.3.2), u fil-każ ta' effetti korrossivi jew irritanti immedjati. Wara 24 siegħa, hasla sewwa tista' ssir jekk dan ikun meqjus bħala xieraq.

L-użu ta' grupp satellit ta' annimali għall-inverigazzjoni ta' l-infuwenza tal-ħasil mhux rakkommandabbi, sakemm ma jkunx xjetifikament ġustifikat. Jekk grupp satellit ikun meħtieġ, għandhom ikunu użati żewġt ifniek. Il-kundizzjonijiet tal-ħasil għandhom ikunu dokumentati bir-reqqa, eż. il-ħiun tal-ħasil; il-komposizzjoni u t-temperatura tat-taħlita tal-ħasil; it-tul ta' żmien, il-volum, u l-veloċità ta' l-applikazzjoni.

1.4.2.3 *Livell tad-doża*

1.4.2.3.1 *It-testijiet tal-likwidi*

Għat-testijiet tal-likwidi, doża ta' 0,1 ml hija użata. Tbexxix bil-pompa m'għandux ikunu użat għall-istallazzjoni diretta ġewwa l-għajn. It-tbexxix tal-likwidu għandu jkun imneħħi u miġbur f'kontenitur qabel ma jkun installat 0,1 ml ġewwa l-għajn.

1.4.2.3.2 *Testijiet tas-solidi*

Meta jsiru t-testijiet ta' solidi, dlik, u sustanzi partikolati, l-ammont użat għandu jkollu volum ta' 0,1 ml jew ġiż ta' mhux aktar minn 100 mg. Il-materjal tat-test għandu jkun miħun fi trab fin. Il-volum tal-materjal solidu għandu jkun imkejjel wara li jkun kumpatt b'ġentilezza, eż. bit-tektik tal-kontenitur tal-kejl. Jekk is-sustanza solida tat-test ma tkun ġiet imneħħija mill-għajn ta' l-annimal tat-tesr b'mekkaniżmi fiżjoloġiċi waqt l-ewwel punt fil-ħin ta' l-osserazzjoni ta' siegħa wara t-trattament, il-għajn tista' tkun imlaħalħa b'ilma bil-melħ jew distillat.

▼B

1.4.2.3.3 *Testijiet ta' aerosols*

Huwa rakkommandat li t-tbexxix kollu bil-pompa u l-aerosols ikun miġbur qabel l-istallazzjoni ġewwa l-għajn. L-eċċezzjoni waħda hija għas-sustanzi f'kontenituri aerosol taħt pressjoni, li ma jistgħux ikunu miġbura minħabba l-vaporizzazzjoni. F'tali każi, l-għajn għandha tinżamm miftuħha, u s-sustanza tat-test somministrata fuq l-għajn bi spunt wieħed għal madwar sekonda, minn distanza ta' 10 cm, direttament minn quddiem il-għajn. Din id-distanza tista' tvarja jiddependi mill-pressa tat-tbexxix u l-kontenuti. Kura għandha tittieħed li ma ssirx ħsara lill-għajn mill-pressa tat-tbexxix. F'każi xierqa, jista' jkun ħemm il-ħtieġa li jkun evalutat il-potenzal dwar ħsara "mekkaanika" ta' l-għajn mill-qawwa tat-tbexxix.

Estimi tad-doża minn aerosol jistgħu isiru bit-test tas-simulazzjoni kif ġej: Is-sustanza hija mbexxa fuq karta ta' l-użin minn fetħa d-daqs ta' għajn ta' fenek imqiegħda direttament qabel il-karta. Iż-żieda fil-piż tal-karta hija użata sabiex ikun ikkalkolat l-ammont imbexxex fuq il-għajn. Għal sustanzi volatili, id-doża tista' tkun ikkalkolata bl-użin ta' kontenitur riċevitur qabel u wara t-tneħħija tal-matyerjal tat-test.

1.4.2.4 *It-test inizjali (It-test in vivo bl-irritazzjoni/korrożjoni ta' l-għajn bl-użu ta' annimal wieħed)*

Kif spjegat fl-istrateġija sekwenzali tat-testijiet (ara l-Anness 1), huwa ferm rakkommandabbli li t-test *in vivo* ikun imwettaq inizjalment bl-użu ta' annimal wieħed.

Jekk ir-riżultati ta' dan it-test jindikaw li s-sustanza tkun severament irritanti jew korrosiva għall-għajnejn bl-użu tal-proċedura deskritta, aktar testiet dwar l-irritazzjoni okulari ma jkunx meħtieġa.

1.4.2.5 *Anastesija lokali*

L-anastesija lokali tista' tkun użata fuq il-bażi ta' każ b'każ. Jekk l-analiżi ta' l-evidenza peżata jindika li s-sustanza jkollha l-potenzal li tikkaġuna l-uġiegħ, jew jekk test inizzjali juri li reazzjoni ta' uġiegħ tkun tirriżulta, anastesija lokali tista' tkun użata qabel l-istallazzjoni tas-sustanza tat-test. It-tip, il-konċentrazzjoni, u d-doża ta' l-anastesija lokali għandhom ikunu magħżula bir-reqqa sabiex jassiguraw li d-differenzi fir-reazzjoni għas-sustanza tat-test ma jkunux jirriżultaw mill-użu tiegħu. Il-għajn tal-kontrol għandha bl-istess mod tkun anastetizzata.

1.4.2.6 *Test konfermatorju (It-test in vivo ta' l-irritazzjoni ta' l-għajn b'annimali addizzjonali)*

Jekk effett korrossic ma jkunx osservat fit-test inizjali, ir-reazzjoni irritanti jew negattiva għandha tkun ikkonfermata bl-użu ta' sa żewġ annimali addizzjonali. Jekk effett irritanti sever ikun osservat fit-test inizjali li jindika l-possibbiltà ta' effett qawwi (mhux riversibbli) fit-testijiet konformatorji, huwa rakkommandat li t-test konformatorju jkun imwettaq b'manjera sekwenzali fuq annimal wieħed kull darba, pjuttost milli l-espożizzjoni ta' żewġ annimali b'mod simultanju. Jekk it-tieni annimal jiżvela effetti severi korrossivi jew irritanti, it-test m'għandux jitkompla. Annimali addizzjonali jistgħu ikunu meħtieġa sabiex jikkonfermaw ir-reazzjonijiet ħfief jew moderati ta' l-irritant.

▼B

1.4.2.7 *Perijodu ta' osservazzjoni*

It-tul ta' żmien ta' l-istudju għandu jkun suffiċjenti sabiex tkun evalwata r-riversabbilità jew in-nuqqas ta' riversabbilità ta' l-effetti osservati. B'dana kollum l-esperiment għandu jkun terminat fi kwalunkwe ħin jekk dak l-annimal ikollu sinjali kontinwi ta' uġiegħ jew tbagħtija qawwija. Sabiex ikunu determinati l-effetti riversibbli, l-annimali għandhom ikunu osservati normalment għal 21 jum wara l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test. Jekk l-irriversibbiltà tkun osservata qabel l-21 jum, l-esperiment għandu jkun imwaqqaf f'dak il-waqt.

1.4.2.7.1 *Osservazzjonijiet kliniċi u l-iggradar tar-reazzjonijiet ta' l-għajn*

L-għajnejn għandhom ikunu eżaminati fi 1, 24, 48 u 72 siegħa wara l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. L-annimali għandhom jinżammu fit-test mhux aktar milli meħtieġ la darba informazzjoni definita tkun ġiet akkwistata. L-annimali li juru kon tinwament uġiegħ u tbagħtija severa għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk, mingħajt dewmien, u s-sustana tkun assessjata kif applikabbli. L-annimali b'dawn il-feriti ta' l-għajnejn wara li jkun kellhom l-istallazzjoni għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk: Xi toqba fil-kornea jew ulċera sinifikanti tal-kornea, inkluża s-stafiloma; demm fil-parti anterjuri ta' l-għajn; opaċità grad 4 tal-kornea li tippersisti għal 48 siegha; nuqqas ta' reazzjoni għad-dawl (nuqqas ta' reazzjoni radiali grad 2) li tippersisti għal 72 siegha; ulċera fil-membrana konjunktivali; nekrożi tal-membrana konjunktivali jew niktitanti; jew qoxra mejta. Dan huwa minħabba l-fatt li tali feriti, ġeneralment, ma humiex riversibbli.

L-annimali li ma jiżviluppawx feriti okulari jistgħu ikunu mneħħija mhux aktar kmieni minn 3 ijiem wara l-istallazzjoni. L-annimali b'feriti ħfief jew moderati għandhom ikunu osservati sakemm il-ferita tkun fieqet, jew għal 21 jum, f'liema waqt l-istudju jkun terminat. L-osservazzjonijiet għandhom ikunu mwettqa fi 7, 14, u 21 jum sabiex ikun determinat l-istat tal-feriti, u r-riversabbiltà jew in-non-riversabbiltà tagħhom.

Il-gradi tar-reazzjoni okkulati (konġunktiva, kornea u iris) għandhom ikunu irreġistrati wara kull eżami (Tabella I). Xi feriti oħrajn ta' l-għajnejn (eż. imtappna, imtebba) jew effetti ħżiena sistematiċi għandhom ukoll ikunu rrapurtati.

L-eżami tar-reazzjonijiet jistgħu ikunu faċilitati bl-użu tal-loupe binokulari, lampa-maqsuma ta' l-idejn, biomikroskopju, jew xi apparat ieħor xieraq. Wara r-reġistrazzjoni ta' l-osservazzjoni fi 24 siegħa, il-għajnejn jistgħu wkoll ikunu eżaminati bil-għajnuna tal-florixxin.

Il-gradar tar-reazzjonijiet okulari hija neċċessarjament suġġestiva. Sabiex tkun imħġeġġa l-armonizzazzjoni fil-gradar tar-reazzjoni okulari u sabiex ikunu mgħejjuna l-laboratorji tat-testijiet u dawk involuti fiż-żamma ta' l-osservazzjonijiet u ta' l-interpretazzjoni tagħhom, il-persunall li jwettaq l-osservazzjonijiet jeħtieġu li jkunu adekwatament imħarrġa fis-sistema ta' l-iggradat kif użata ara t-Tabella ta' hawn taħt).

2. **DATA**

2.2 EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Il-marki ta' l-irritazzjoni dermali għandhom ikunu evalwati b'konnessjoni man-natura u s-severità tal-feriti, u r-riversibbilità tagħhom, jew tan-nuqqas ta' riversibbilità. Il-marki individwali ma jkunux jirrapreżentaw norma assoluta għall-propjetajiet irritanti ta' xi materja, minħabba li effetti oħrajn tal-materjal tat-test huma wkoll evalwati. Minflok, il-marki individwali għandhom ikunu riveduti bħala valuri ta' referenza u jagħmlu sens biss meta jkunu sostnuti b'deskrizzjoni sħiħa u l-evalwazzjoni ta' l-osservazzjonijiet kollha.

▼B

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1 RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Raġunar dwar it-test *in vivo*: Analiżi ta' l-evidenza peżata ta' informazzjoni pre-eżistenti qabel it-test, inklużi r-riżultati minn strateġija ta' testijiet sekwenzali:

— deskrizzjoni tad-dettalji relevanti disponibbli minn testijiet preċedenti;

— informazzjoni akkwistat f'kull stadju ta' l-istrateġija ta' l-ittestjar;

— deskrizzjoni tat-testijiet *in vitro* kif imwettqa, inklużi d-dettalji tal-proċeduri, ir-riżultati akkwistati bis-sustanza tat-test/referenza;

— deskrizzjoni ta' l-istudju *in vivo* dwar l-irritazzjoni/korrożjoni dermali li jkun ġie mwettaq, inklużi r-riżultati akkwistati;

— analiżi ta' l-evidenza peżata għat-twettieq ta' l-istudju *in vivo*

Is-sustanza tat-test:

— dettalji ta' l-identifikazzjoni (eż. numru CAS; sorsi; purità; impuritajiet magħrufa; n-numru tal-lot);

— in-natura fiżika u l-propjetajiet fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, solubilità, stabbilità, reattività fl-ilma);

— jekk taħlita, il-komposizzjoni u l-persentaġġi relattivi tal-komponenti;

— jekk anastesija lokali tkun ġiet użata, l-identifikazzjoni, il-purità, it-tip, id-doża, u l-potenzal ta' interazzjoni mas-sustanza tat-test.

Mezz:

— l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (meta xieraq), il-volum użat;

— il-ġustifikazzjoni tal-mezz użat.

Annimali tat-test:

— l-ispeċji/tipi użati, ir-raġjunar għall-użu ta' l-annimali apparti milli fniek albino;

— l-età ta' kull annimal fil-bidu ta' l-istudju;

— in-numru ta' l-annimali ta' kull sess użati fit-test u fil-grupp ta' kontroll (jekk meħtieġ);

— il-piżijiet ta' l-annimali individwali, kemm fil-bidu u wkoll fil-konklużjoni tat-test;

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, eċċ.

Riżultati:

— deskrizzjoni tal-metodu użat biex tkun immarkata l-irritazzjoni f'kull ħil ta' l-osservazzjoni (eż. lampa maqsuma ta' l-idejn, bimikroskopju, florexxin);

▼B

— tabulazzjoni tad-dettalji tar-reazzjoni dwar l-irritamnt/korrosiv għal kull annimali f'kull ħin ta' l-osservazzjoni jew sa kemm kull animal ikun tneħħa mit-test;

— deskrizzjoni narrattiva tal-grad u n-natura ta' l-irritazzjoni jew tal-korrożjoni osservata;

— deskrizzjoni ta' xi ferita oħra osservata fil-għajn (eż. vaskularizzazzjoni, formazzjoni imtappna, waħħalija, tgħagħjja);

— deskrizzjoni ta' effetti ħżiena mhux okulari, lokali u sistematiċi, u s-sejbiet ħistopatoloġiċi, jekk ikun hemm.

Diskussjoni tar-riżultati.

3.2 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

L-estrapolazzjoni tar-rżultati ta' l-istudji dwar l-irritazzjoni ta' l-għajn li jkun twettqu fuq l-annimali tal-laboratorju lejn bnedmin umani hija valida biss sa grad limitat. F'ħafna każi, il-fenek albimo huwa iktar sensittiv mill-bnedmin dwar l-irritanti okulari jew għall-korrossivi.

Attenzjoni għandha tingħata fl-interpretazzjoni tad-dettalji sabiex tkun eskluża xi irritazzjoni li tirriżulta minn infezzjoni sekondarja.

4. **REFERENZI**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In vitro*, 2, 19-26.

(5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) L-istudju ta' validazzjoni internazzjonali ECVAM dwar it-testijiet *in vitro* għall-korrossività tal-ġilda. 2. Irriżultati u l-evalwazzjoni mill-Grupp Amministrattiv Toxicology *in vitro* 12, pp. 483–524.

(6a) Metodu tat-test B.40, Korrożjoni tal-Ġilda

(7) Metodu tat-testijiet B.4. Tossiċità akuta Irritazzjoni/korrużjoni dermali.

(8) Programm ta' Linji ta' Gwida għat-Test OECD (1996): Rapport Finali tal-Grupp ta' Studju OECD dwar l-Armonizzazzjoni tal-Validazzjoni u l-Aċċettazzjoni tal-Kriterja dwar Metodi Alternattivi għal-Testijiet Tossikoloġiċi. Li inżamm fi Solna, l-Isvezja, 22-24 ta' Jannar 1996. (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998), Is-Sistema tal-Klassifika Integrata Armonizzata tal-Perikoli għas-Saħħa Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kumiċi, kif approvat mit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat tal-Kimika u tal-Grupp ta' Ħidma dwart il-Kimika, Novembru 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) Dokument ta' Gwida dwar ir-Rikonoxximent, l-Assessjar u l-Użu ta' Sinjali Kliniċi bħala għanijiet finali umanitarji għall-annimali Sperimenti Użati fl-Evalwazzjoni tas-Sigurtà. OECD, Pubblikazzjonijiet dwar is-Saħħa u s-Sigurtà Ambjentali. Serje dwar it-Testijiet u l-Istudju Nru. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Tabella I

L-IGGRADAR TAL-FERITI OKULARI

Il-kornea

L-opaċità: il-grad ta' densità (il-qari għandu jsittieħed mill-iktar żona densa) (*)

L-ebda ulċerazzjoni jew opaċità	0
Żoni mferrxa jew diffużi ta' opaċità (minnbarra l-oskurità ħafifa jew il-leqqa normali); id-dettaliji ta' l-iris huma viżibbli sew	1
Żona *transluscent* li tidher faċilment; id-dettalji ta' l-iris kemmxejn imdallma	2
Żona *nacrous*; l-ebda dettal ta' l-iris ma jidher; id-daqs tal-pupill bilkemm jidher	3
Kornea opaka; l-iris ma tidhirx mill-opaċità	4

Il-massimu possibbli: 4

NOTI

(*) Iż-żona ta' l-opaċità tal-kornea trid tiġi nnutata

L-iris

Normali	0
Tikmix fond, konġestjoni, infiħ, *circumcorneal hyperaemia* ħafifa; Jew l-injezzjoni; l-iris li tirreaġixxi għad-dawl (reazzjoni għajjiena hija meqjusa bħala effetts)	1
Emoraġġija, ħsara grossa, jew l-ebda reazzjoni għad-dawl	2

Il-massimu possibbli: 2

Conjunctivae

Il-ħmura (tirreferi għall- conjunctivae palpebrali u bulbari; il-kornea u l-iris huma esklużi)

Normali	0
Xi vini tad-demm *hyperaemic* (injettati)	1
Diffuż, kulur aħmar skur; il-vini individwali ma jidhrux faċilment	2
Diffuż aħmar mimli	3

Il-massimu possibbli: 3

Chemosis

l-infiħ (jirreferi għall-kpiepel u/jew il-membrani li jiċċaqalqu)

Normali	0
Xi nfiħ iktar min-normal	1
Infiħ ovvju, b'averżjoni parzjali tal-kpiepel	2
L-infiħ, bil-kpiepel kważi nofshom magħluqin	3
L-infiħ, bil-kpiepel iktar minn nofshom magħluqin	4

Il-massimu possibbli: 4

▼B

ANNESS

Strateġija ta' testijiet Sekwenzali dwar l-Irritazzjoni u l-Korrożjoni ta' l-Għajnejn

KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI

Fl-imnteressi ta' xjenza soda u l-ġid ta' l-annimali, huwa importanti li jkun evitat l-użu bla bżonn ta' l-annimali, u jkun imnaqqas it-testjar li aktar jipproduċi reazzjonijiet serveri fl-annimali. L-informazzjoni kollha dwar sustanza relatata mal-potenzal tagħha ta' l-irritazzjoni/korrożjoni okulari għandha tkun evalwata bil-quddiem qabel ma jkunu ikkonsidrati t-testijiet *in vivo*. Evidenza suffiċjenti tista' tkun diġa teżisti sabiex tikklassifika sustanza tat-test dwar l-irritazzjoni ta' l-għajnejn jew tal-potenzal tal-korrożjoni mingħajr il-ħtieġa li jkunu mwettqa testijiet fuq l-annimali tal-laboratorju. Għalhekk, l-utilizzsazzjoni ta' l-analiżi pożata bl-evidenza u l-istrateġija sussegwenti tat-testijiet għandha tnaqqas il-ħtieġa ta' testijiet *in vivo*, speċjalemnt jekk is-sustanza aktarx li tipproduċi reazzjonijiet severi.

Huwa rakkommandabbli li l-analiżi ta' l-evidenza pożata tkun użata għall-evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti li tappartieni għas-sustanzi ta' l-irritazzjoni u l-korrożjoni ta' l-għajnejn u sabiex tiddetermina jekk studju addizzjonali, apparti milli l-istudji *in vivo* fuq l-għajnejn, għandhom ikun u mwettqa sabiex jgħinu dwar il-karatteristiċi ta' tali potenzal. Meta aktar studji huma meħtieġa, huwa rakkommandabbli li l-istrateġija ta' testijiet sekwenzali tkun utilizzata sabie tiżviluppa d-dettalji sperimentali relevanti. Għal sustanzi li ma jkollhom l-ebda storja ta' testijiet, l-istrateġija tat-testijiet sekwenzali għandha tkun utilizzata sabiex jiżviluppa l-informazzjoni meħtieġa għall-evalwazzjoni tal-korrożjoni/-irritazzjoni tagħha fuq l-għajnejn. L-istrateġija tat-testijiet deskritta f'dan l-Anness kienet ġiet żviluppata minn grupp ta' ħidma tal-OECD (1). Kienet sussegwentament ikkonfermata u mkabbra fis-sistema tal-Klassifa Armonizzata Integrata dwar is-Saħħa Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kimiċi, kif ikkonfermata bit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat tal-Kimiċi u tal-Grupp ta' Ħidma dwar il-Kimiċi, f'Novembru 1998 (2).

Għalkemm din l-istrateġija tat-testijiet mhix parti integrali tal-metodu tat-testijiet B.5, din tesprimi r-resqien rakkommandat għad-determinazzjoni tal-propjetajiet ta' l-irritazzjoni/korrożjoni ta' l-għajnejn. Dan ir-resqien jirrapreżenta kemm l-aħjar prassi u l-mira etika dwar testijiet *in vivo* ta' l-irritazzjoni korrożjoni ta' l-għajnejn. Il-metodu tat-testijiet jipprovdi gwida għat-twettieq tat-test *in vivo* u sommarji u fatturi li għandhom ikunu ndirizzati qabel ma jkun ikkonsidrat tali test. L-istrateġija tat-testijiet sekwenzali tipprovdi r-resqien ta' l-evidenza pożata għall-evalwazzjoni ta' informazzjoni eżistenti dwar il-propjetajiet ta' l-irritazzjoni/kjorrożjoni ta' l-għajnejn, ta'sustanza, u tar-resqien imtarraġ għall-ġenerazzjoni ta' l-informazzjoni relevanti dwar sustanzi li dwarhom studju addizzjonali huma meħtieġa jew li dwarhom l-ebda studji ma kienu twettqu. L-istrateġija tinkludi it-twettieq, l-ewwel ta' testijiet tal-validazzjoni u l-aċċettazzjoni *in vitro* jew *ex vivo*, u imbagħad il-metodu tat-test B.4 ta' studji dwar l-irritazzjoni/korrożjoni tal-ġilda skond iċ-ċirkostanzi speċifiċi (3) (4).

DESKRIZZJONI TA' L-ISTRATEĠIJA GĦAL TESTIJIET PASS B'PASS

Qamel ma jitqettqu t-testijiet bħala parti mill-istrateġija tat-testijiet sekwenżjali (il-Figura), l-informazzjoni disponibbli kollha għandha tkun evalutata għad-determinazzjoni tal-ħtieġa tat-testijiet *in vivo* fuq l-għajnejn. Għalkemm informazzjoni sinifikanti tista' tkun akkwistata mill-evalwazzjoni ta' parametri singoli (eż. pH estrema), it-totalità ta' l-informazzjoni eżistenti għandha tkun assessjata. L-informazzjoni relevanti kollha dwar l-effetti tas-sustanza f'dak il-każ, u ta' l-analogi strutturali tagħha, għandhom ikunu evalutati fit-teħid tad-deċiżjoni ta' l-evidenza pożata, u r-raġjunar għad-deċiżjoni għandu jkun ippreżentat. L-emfasi primarja għandha tkun fuq l-informazzjoni jmana u ta' l-annimali eżistenti risward is-sustanza, segwita bl-eżitu tat-testijiet *in vitro* jew *ex vivo*. L-istudji *in vivo* ta' sustanzi korrosivi għandhom ikunu evitati, kull meta jkun possibbli. Il-fatturi meqjusa għall-istrateġija tat-testijiet, jinkludu:

▼B

Evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti, umana u ta' l-annimali (il-Pass 1). Informazzjoni eżistenti umana, eż. studji kliniċi u okkupazzjonali, u rapporti dwar il-każ, u/jew informazzjoni minn testijiet fuq l-annimali minn studji okulari għandhom ikun ikkunsidrata bħala l-ewwel ħaġa, minħabba li dawn jipprovdu informazzjoni relatata direttament ma l-effetti fuq l-għajnejn. Wara dan, l-informazzjoni disponibbli mill-istudji umani u/jew ta' l-annimali, li jinvestigaw korrożjoni/irritazzjoni dermali, għandhom ikunu evalutati. Sustanzi b'korrossività magħrufa jew ta' irritazzjoni severa, fuq l-għajnejn, m'għandhomx ikunu imdeffsa fuq l-għajnejn ta' l-annimali, u l-anqas m'għandhom is-sustanzi li juru effetti korrossivi jew irritanti fuq il-ġilda; tali sustanzi għandhom ikunu meqjusa bħala korrossivi u/jew irritanti għall-għajnejn, ukoll. Sustanzi b'evidenza suffiċjenti ta' non-korrossività u non-irritazzjoni, minn studji okulari preċedenti diġa mwettqa, għandhom ukoll ma jkunux ittestjati fi studji *in vivo* fuq l-għajnejn.

Analiżi tar-relazzjonijietta' l-attività strutturali (SAR) (il-Pass 2). Ir-riżultati tat-testijiet ta' kimika strutturalment relatata għandhom ikunu ikkunsidrati, jekk disponibbli. Meta informazzjoni, umana u/jew ta' l-annimali, suffiċjenti, tkun disponibbli dwar sustanzi jew taħlitiet strutturalment relatati ta' tali sustanzi li jindikaw il-potenzal tal-korrożjoni/irristazzjoni ta' l-għajnejn, dan għandu jkun present li s-sustanza tat-test tkun sejra tipproduċi l-istess reazzjonijiet. F'dawk il-każi, is-sustanza ma jkunx hemm ħtieġa tat-test tagħha. Informazzjoni negattiva mill-istudji tas-sustanzi strutturalment relatati jew minn taħlitiet ta' tali sustanzi ma tkunx tikkostitwixxi evidenża suffiċjenti tan-non-korrosività/non-irrittabbilità ta' sustanza permezz ta' l-istrateġija tat-testijiet sekwenzali. Ir-resqien SAR validat u aċċettat għandu jkun użat sabiex jidentifika l-korrożjoni u l-irrirtazzjoni potenzali kemm ta' l-effett dermali u wkoll okulari.

Propjetajiet fiżikokimiċi u r-reattivazzjoni kimika (il-Passa 3). Is-sustanzi li jesebixxu pH estremi bħal ma huma ≤2.0 jew ≥11.5 jistgħu ikollhom effetti lokali ferm qawwija. Jekk il-pH estrema hija l-bażi għall-identifikazzjoni ta' sustanza bħala korrossiva jew irritanti għall-għajnejn, allura ir-riserva aċida/-alkalina tagħha (il-kapaċità mewwitea) tista' wkoll tkun ikkunsidrata (5) (6). Jekk il-kapaċità mewwieta tissuġġerixxi lki sustanza ma tistgħax tkun korrossiva għall-għajnejn, allura aktar testijiet għandhom ikunu mwettqa sabiex jikkonfermaw dan, preferibbilment bl-użu ta' test *in vitro* jew *ex vivo* validat u aċċettat (ara s-sezzjoni, il-pass 5 u 6).

Konsiderazzjoni ta' informazzjoni eżistenti oħra (il-Pass 4). L-informazzjoni disponibbli kollha dwar it-tossiċità sistematika permezz tar-rotta dermali għandha tkun evalutata f'dan l- istadju. It-tossiċità dermali akuta tas-sustanza tat-test għandha wkoll tkun ikkonsidrata. Jekk is-susrtanza tat-test tkun uriet li hija ferm tossika bir-rotta dermali, din ma tkunx teħtieġ li tkun ittestjata fl-għajnejn. Għalkemm mhux bilfors li neċessarjament hemm relazzjoni bejn it-tossiċità akuta dermali u l-irritazzjoni/korrożjonu ta' l-għajnejn, dan jista' jkun preżent jekk aġent li huwa ferm tossiku via ir-rotta dermali, dan ikun ukoll jesebixxi tossiċità għolja meta jkun imqiegħed fuq l-għajnejn. Tali informazzjoni tista' wkoll tkun ikkonsidrata bejn il-Passi 2 u 3.

Ir-riżultati mit-testijiet in vitro jew ex vivo (il-Passi 5 u 6). Is-sustanzi li jkunu wrew propjetajiet severi korrossivi jew irritanti f'test in *vitro* jew *ex vivo* (7) (8) li jkunu ġew validati u aċċettati għall-istudju speċifikament dwar il-kossossività/-irritazzjoni ta' l-għajnejn jew tal-ġilda, ma jeħtieġx li jkunu ittestjati fuq l-annimali. Jista' jkun preżent li tali sustanzi jkunu jipproduċu l-istess effetti severi *in vivo*. Jekk it-testijiet *in vitro*/*ex vivo* validati u aċċettati ma jkunux disponibbli, wieħed għandu jevita il-Passi 5 u 6 u jipproċiedi direttament għall-Pass 7.

Assessjar ta' l-irritazzjoni jew tal-korrożjoni dermali in vivo tas-sustanza (il-Pass 7). Meta evidenza mhux suffiċjenti tkun teżisti li permezz tagħha tista' titwettaq analiżi konklussiva ta' l-evidenza peżata tal-potenzal ta' l-irritazzjoni/korrossività ta' l-għajnejn minn sustanza, li tkun ibbażata fuq inforazzjoni mill-istudji elenkati hawn fuq, il-potenzal ta' l-irritazzjoni/korrożjoni *in vivo* għandha l-ewwel tkun evalutata, bl-użu tal-metodu B.4 (4) u ta' l-Anness li hemm miegħu (9). Jekk is-sustanza turi li tipproduċi korrożjoni jew irritazzjoni severa tal-ġilda, din għandha tkun ikkunsidrata bħala li hija irritant korrossiv għall-għajnejn sakemm informazzjoni oħra tkun tappoġġja konklużjoni alternattiva. B'hekk, it-test *in vivo* fuq l-għajnejn ma jkunx hemm ħtieġa li jitwettaq. Jekk is-sustanza ma tkunx korrossiva jew severament irritanti għall-ġilda, it-test *in vivo* fuq l-għajnejn jenħtieġ li jkun imwettaq.

▼B

Test in vivo fuq il-fniek (il-Passi 8 u 9): Testijiet okulari *in vivo* għandhom ikunu mibdija b'test inizjali li juża annimali wieħed. Jekk ir-riżultati ta' dan it-test jindikaw li s-sustanza tkun severament irritanti jew korrosiva għall-għajnejn, aktar testiet ma jkunx meħtieġa. Jekk dak it-test ma jiżvelax xi effetti korrossivi jew severi, test konfermatorju ikun imwettaq b'żewġ annimali oħrajn.

REFERENZI

(1) Programm ta' Linji ta' Gwida għat-Test OECD (1996): Rapport Finali tal-Grupp ta' Studju OECD dwar l-Armonizzazzjoni tal-Validazzjoni u l-Aċċettazzjoni tal-Kriterja dwar Metodi Alternattivi għal-Testijiet Tossikoloġiċi. Li inżamm fi Solna, l-Isvezja, 22-24 ta' Jannar 1996. (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998), Is-Sistema tal-Klassifika Integrata Armonizzata tal-Perikoli għas-Saħħa Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kumiċi, kif approvat mit-28 Laqgħa Konġunta tal-Kumitat tal-Kimika u tal-Grupp ta' Ħidma dwart il-Kimika, Novembru 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Metodu tat-testijiet B.4. Tossiċità akuta: Irritazzjoni/korużjoni dermali.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In vitro*, 2, 19-26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) L-istudju ta' validazzjoni internazzjonali ECVAM dwar it-testijiet *in vitro* għall-korrossività tal-ġilda. 2. Ir-riżultati u l-evalwazzjoni mill-Grupp Amministrattiv Toxicology *in vitro* 12, pp. 483–524.

(8) Metodu tat-test B.40, Korrożjoni tal-Ġilda

(9) Anness tal-Metodu tat-Test B.4: Strateġija ta' testijiet Sekwenzali dwar l-Irritazzjoni u l-Korrożjoni tal-ġilda.

▼B

Figura

Strateġija għat-testijiet u l-evelwazzjom ta' L-Irritazzjoni/korrożjoni dermali

	Attività	Sejbiet	Konklu”joni
1	Dettalji ezistenti dwar il-bnedmin u.jew 1-annimali li juru effetti fuq l-ghajnejn	Ħsara severa ghall-ghajnejn	Għan finali atipiku; meqjusha bħala korrossiva. L-ebda test m’hu meħtieg L-
		Irritant fl-ghajejn	Għan finali atipiku; meqjusha bħala korrossiva. L-ebda test m’hu meħtieg L-
		Mhux-korrossiv / mhux irritanti għall-għajnejn	Għan finali atipiku; meqjusha bħala korrossiva jew irritanti. L-ebda test m’hu mehtieġ.
	Dettalji ezistenti dwar il-bnedmin u.jew 1-annimali li juru effetti fuq il-ġilda.	Korrożjoni tal-ġilda	Assumi l-korrossività. L-ebda test m’hu meħtieġ.
	Dettalji ezistenti dwar il-bnedmin u.jew 1-annimali li juru effetti fuq irritanti severi fuq il-ġilda	Irritazzjoni severa tal-ġ ilda	Assumi l-korrossività. L-ebda test m’hu meħtieġ.
	↓		
	L-ebda informazzjoni ma hija disponibbli jew l-informazzjoni disponibbli mhix konklussiva		
	↓		
2	Wettaq evalwazzjoni SAR dwar il-korrossività/irritazzjoni ta’ 1-ghajnejn	Ħsara severa hi mbassra ghall-ghajnejn	Assumi l-korrossività. L-ebda test m’hu meħtieġ.
		Previżjoni ta’ irritazzjoni ghall-ghajnejn	Assumi l-korrossività. L-ebda test m’hu meħtieġ.
	Wettaq evalwazzjoni SAR dwar il-korrossività tal-ġilda	Previżjoni ta’ korrossità tal-ġilda	Assumi l-korrossività. L-ebda test m’hu meħtieġ.
	↓		
	L-ebda previżjonijiet ma jistgħu isiru, jew il-previżjonijiet huma mhux-konklussivi jew negattivi		
	↓		
3	Miżura pH (ikkunsidra-kapaċità mewwieta, jekk relevanti	pH ≤ 2 jew ≥ 11,5 b’kapacità mewwieta, jekk releventi)	Assumi l-korrossività. L-ebda test m’hu meħtieġ.
	↓		
	2 < pH < 11,5, jew pH ≤ 2 jew pH ≥ 11,5 b’kapacità mewwieta baxxa / jew mingħajra, jekk releventi		
	↓		
4	Evalwazzjoni siststematika ta’ l-informazzjoni tossikoloġika via ir-rotta dermali	Ferm tossika f’konċentrazzjonijiet li jkunu ittestjati fuq il-ghajn	Is-sustana tkun ferm tossika ghat-testijiet. L-ebda test m’hu mehtieg.
	↓		
	Tali informazzjoni mhix disponibbli jew is- sustanza mhix ferm tassika		
	↓		

▼B

5	Wettaq test validat u aċċettat, *in vitro* jew *ex vivo* dwar il-korrozjoni ta'l-ghajn	Reazzjoni korrossiva	Assumi l-korrossività in vivo. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ.
	↓		
	Is-sustanza mhix korrossiva jew validate bil-metodu tat-testijiet in vitro *jew* ex vivo *dwar il-korożżjoni ta' l-ghajnejn ma humiex disponibbli*		
	↓		
6	Wettaq test validat u aċċettat, *in vitro* jew *ex vivo* dwar il-korrożjoni ta' l-għajejn	Reazzjoni irritanti	Assumi l-korrossività. L-ebda tesc ieħor m'hu meħtieġ.
	↓		
	Is-sustanza mhix korrossiva jew validate bil metodu tat-testijiet in vitro *jew* ex vivo *dwar il-korożżjoni ta' l-ghajnejn ma humiex disponibbli*		
	↓		
7	Wettaq studju *in vivo* b'mod sperimentali għall-potenzal ta' l-irritazzjoni/korrożjoni tal-ġilfa (ara l-Metodu B.4 tat-testijiet inkluża fl-Anness)	Reazzjoni korrossiva jew ferm irritanti	Assumi l-korrossività. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ
	↓		
	Is-sustanza mhix korrossiva jew severament irritanti għall-gilda		
	↓		
8	Wettaq test inizjali *in vivo* fuq il-fniek bl-użu ta' animal wieħed.	Ħsara severa għall-għajnejn	Meqjusha korrossiva. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ.
	↓		
	L-ebda ħsara severa, jew l-ebda reazzjoni		
	↓		
9	Wettaq test konfermatorju bl-użu ta' wieħed jew tnejn annimali addizzjonali	Korrossiva jew irritanti	Meqjusha korrossiva, L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ.
		Mhux korrossiva / mhux irritanti	Meqjusha mhux irritanti u mhux korrossiva għall-ghajnejn. L-ebda test ieħor m'hu meħtieġ.

▼B

B.6. **SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Rimarki:

Is-sensittività u l-abbiltà tat-testijiet li jintebħu b'sensitizzaturu potenzali għall-ġilda umana huma meqjusa bħala importanti fis-sistema tal-klassifikazzjoni dwar it-tossiċità relevanti għas-saħħa pubblika.

M'hemm l-ebda metodu wieħed ta' test li b'mod adegwat jidentifika s-sustanzi kollha bil-potenzjal għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda umana u li huwa relevanti għas-sustanzi kollha.

Fatturi bħalma huma l-karatteristċi fiżiċi ta' sustanza, inkluża l-abbiltà tagħha li tippenetra l-ġilda, għandhom ikunu meqjusa fil-għażla tat-test.

Żewġ tipi ta' testijiet bl-użu tal-fniek ta' l-indi ġew żviluppati: testijiet tat-tip adġuvanti, li fihom l-istat ellerġiku jkun ippotenzjat bit-taħlil jew bis-sospensjoni tas-sustanza tat-test fi Freunds Complete Adjuvant (FCA), u f'testijiet mhux adġuvanti.

Testijiet tat-tip adġuvanti pjuttost li jkunu aktar eżatti fit-tbassir ta' effett sensitizzanti probabbli tal-ġilda ta' sustanza fuq il-bniedem milli dawk il-metodi li ma jutilizzawx il-Freunds Complete Adjuvant u huma għalhekk il-metodi preferiti.

It-test tal-Massimizzazzjoni tal-Fenek ta' l-Indi (GPMT) huwa test tat-tip adġuvanti ferm użat. Għalkemm diversi metodi oħrajn jistgħu jkunu użati għas-sejbien tal-potenzjal ta' sustanza li tikkaġuna reazzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, il-GPMT huwa meqjusa bħala li huma t-teknika adġuvinanti preferuta.

B'ħafna mill-klassijiet kimiċi, testijiet mhux-adġuvinanti (dak preferut huwa t-test Buehler) huma meqjusa bħala li huma anqas sensittivi.

F'ċerti każi jista' jkun hemm raġunijiet tajbin għall-għażla tat-test Buehler li jinvolvi applikazzjoni topika pjuttost milli l-injezzjoni intradermali użata fit-Test tal-Massimizzazzjoni tal-Fenek ta' l-Indi. Ġustifikazzjoni xjentifika għandha tkun mogħtija meta t-test Buehler ikun użat.

It-Test tal-Massimizzazzjoni tal-fenek ta' l-Indi (GPMT) u t-test Buehler huma deskritti f'dan il-metodu. Metodi oħrajn jistgħu ikunu użati basta li dawn ikunu validati tajjeb u l-ġustifikazzjoni xjentifika tkun mogħtija.

Jekk ikun jidher riżultat pożittiv f'test ta' screening rikonoxxut, sustanza tat-test jista' jiġi ddisinjat bħala sensitizzatur potenzjali, u jista' ma jkunx meħtieġ test ieħor fuq il-fniek ta' l-Indi. Madankollu, jekk ikun hemm riżultat negattiv f'test bħal dan, it-test fuq il-fniek ta' l-Indi jrid isir bil-proċedura deskritta f'dan il-metodu tat-test.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: (kuntatt allerġiku *dermatitis*) hija reazzjoni immunoloġikament *cutaneous* għas-sustanza. Fil-bniedem, ir-rispons jista' jkun karatterizzat minn *pruritis, erythema, oedema, papules, vesicles, bullae* jew kombinazzjoni ta' dawn. Fi speċje oħra ir-reazzjonijiet jistgħu ivarjaw u l-*erythemau* l- *oedema* biss jistgħu jidhru.

Espożizzjoni ta' induzzjoni: espożizzjoni sperimentali ta' suġġett għal sustanza tat-test bil-ħsieb li joħloq stat ipersensittiv.

Il-perjodu ta' induzzjoni: perjodu ta' mill-inqas ġimgħa wara l-espożizzjoni ta' induzzjoni li matulu jista' jiżviluppa stat ipersensittiv.

Espożizzjoni ta' tħaqqieq: espożizzjoni sperimentali ta' suġġett li jkun ġie trattat qabel għas-sustanza tat-test wara l-perjodu ta' induzzjoni, sabiex jiġi determinat jekk is-suġġett jirreaġixxix b'mod ipersensittiv.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sensittività u l-kredibilità tat-teknika sperimentali għandha tiġi valutata kull sitt xhur bl-użu tas-sustanzi, li huma magħrufa li jkollhom proprjetajiet ta' sensitizzazzjoni għall-ġilda ħfief għal moderati.

F'test magħmul sew, huwa mistenni li għal sesitizzaturi ħfief għal moderati jkun hemm rispons ta' mill-inqas 30 % f'test adġuvinanti u mill-inqas 15 % f'test li mhux adġuvinanti.

Is-sustanzi li ġejjin huma preferuti.

Numri CAS	Numri EINECS	Ismijiet EINECS	Ismijiet komuni
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldehyde	α-hexylcinnamaldehyde
149-30-4	205-736-8	Benzothiazole-2-thiol (mercaptobenzothiazole)	kaptax
94-09-7	202-303-5	Benzocaine	norcaine

Jista' jkun hemm ċirkustanzi fejn, b'ġustifikazzjoni adegwata mogħtija jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll oħra li jissodisfaw il-kriterji t'hawn fuq.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

L-annimali għat-test huma esposti fil-bidu għas-sustanza tat-test permezz ta' injezzjonijiet intradermali u/jew applikazzjoni epidermali espożizzjoni ta' induzzjoni). Wara perjodu ta' waqfa ta' minn 10 sa 14-il jum (perjodu ta' induzzjoni), li matulu jista' jiżviluppa rispons ta' immunità, l-annimali jiġu esposti għal doża ta' tħaqqieq. Il-grad u l-firxa tar-reazzjoni tal-ġilda għall-espożizzjoni ta' tħaqqieq fl-annimali għat-test huma mqabbla ma' dak li ntwera fl-annimali ta' kontroll li jġarrbu l-istess trattament waqt l-induzzjoni u jirċievu l-espożizzjoni ta' tħaqqieq.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODI TAT-TEST

Jekk it-tneħħija tas-sustanza tat-test hija meħtieġa, dan għandu jinkiseb bl-użu ta' l-ilma jew solvent xieraq mingħajr bidla fir-rispons li jkun hemm jew fl-integrità ta' l-epidermi.

▼B

1.5.1. *Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek ta' l-Indi (TMFI)*

1.5.1.1. P r e p a r a z z j o n i j i e t

Fniek ta' l-indi albino, żgħażagħ u b'saħħithom jadattaw għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju mill-inqas 5 ijiem qabel it-test. Qabel it-test, l-annimali jingħażlu bl-addoċċ fi gruppi ta' trattament. It-tneħħija tax-xagħar isir permezz ta' l-ikklippjar, tqaxxir jew possibilment depolazzjoni kemikali, skond il-metodu tat-test użat. Għandha tingħata attenzjoni sabiex il-ġilda ma tiġix migrufa. L-annimali jintiżnu qabel jibda t-test u fi tmiemu.

1.5.1.2. K u n d i z z j o n i j i e t t a t - t e s t

1.5.1.2.1. Annimali għat-test

Razzez tal-fniek ta' l-indi albino normalment użati fil-laboratorju huma utilizzati

1.5.1.2.2. In-numru u s-sess

Annimali maskili u/jew femminili jistgħu ikunu użati. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma welldu u li mhumiex tqal.

Minimu ta' 10 annimali huma użati fil-grupp ittrattat u mill-anqas 5 fil-grupp tal-kontroll. Meta inqas minn 20 test u 10 fniek ta' l-Indi jkunu ntużaw, u mhux possibbli tikkonkludi li s-sustanza għat-test hija sensitizzatur, huwa rakkomandat ħafna li jiġu ttestjati iktar annimali sabiex ikun hemm mill-inqas total ta' 20 test u 10 annimali tal-kontroll.

1.5.1.2.3. Livelli tad-doża

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija aġġustata lejn livell li jipproduċi xi ftit ta' l-evidenza ta' l-irritazzjoni tal-ġilda, imma li tkun tollerata tajjeb mill-annimali matul kull stadju ta' l-induzzjoni. Il-konċentrazzjoni użata għandha tkun il-massimu li ma jipproduċi l-ebda evidenza ta' l-irritazzjoni tal-ġilda f'annimali li mhumiex sensitizzati. Dawn il-konċentrazzjoninijiet jistgħu jkunu determinati fi skala żgħira b'żewġ jew tliet annimali waqt l-istudju pilota ladarba informazzjoni oħra ma tkunx disponibbli. L-annimali trattati bl-FCA għandhom jiġu kkunsidrati għal dan il-għan.

1.5.1.3. I l - P r o ċ e d u r a

1.5.1.3.1. L-induzzjoni

Jum 0 – il-grupp ittrattat

Il-pari segwenti ta' injezzjonijiet intradermali, kull waħda ta' 0,1 ml, huma mogħtija fiż-żona ta' l-ispalla li ma jkollhiex suf hekk li kull wieħed mill-pari jkun fuq kull naħa taċ-ċentru ta' l-annimal.

Injezzjoni 1: it-taħlita ta' (v/v) FCA/l-ilma jew salin fiżjoloġiku 1:1

Injezzjoni 2: is-sustanza tat-test, bil-mezz xieraq u bil-konċentrazzjoni magħżula

Injezzjoni 3:is-sustanza tat-test bil-konċentrazzjoni magħżula fformulata f'taħlita 1:1 (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjoloġiku

▼B

Fl-injezzjoni 3, is-sustanzi li jinħallu fl-ilma huma mdewba fil-fażi akweja qabel it-taħlit ma' l-FCA. Is-sustanzi liposolubbli jew insolubbli huma mdendla fl-FCA qabel il-kombinazzjoni mal-fażi akweja. Il-konċentrazzjoni finali tas-sustanza għat-test għandha tkun ugwali għal dik użata fit-2 injezzjoni.

L-injezzjonijiet 1 u 2 jingħataw waħda wara l-oħra u qrib ir-ras kemm jista' jkun, waqt illi l-injezzjoni 3 tkun lejn il-parti kawdjali taż-żona tat-test.

Jum 0 – il-grupp tal-kontroll

It-tliet pari ta' injezzjonijiet intradermali ta' 0,1 ml f'volum il-waħda jingħataw fl-istess żoni bħal fl-annimali trattati.

Injezzjoni 1: it-taħlita (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjoliġiku 1:1

Injezzjoni 2: il-mezz mhux maħlul fl-ilma

Injezzjoni 3: formulazzjoni ta' 50 % w/v tal-mezz f'taħlita (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjoloġiku 1:1

5-7 jum – gruppi ta' kontroll trattati

Bejn wieħed u ieħor erbgħa u għoxrin siegħa qabel l-applikazzjoni ta' l-induzzjoni topikali, jekk is-sustanza mhix irritanti għall-ġilda, iż-żona tat-test, wara l-ikklippjar u/jew it-tqaxxir tiġi trattata b'0,5 ml ta' 10 % mis- sulfat lawrju tas-sodju fil-vażelina, sabiex tinħoloq irritazzjoni lokali.

Jum 6-8 tal-grupp trattat

Iż-żona tat-test terġa' titnaddaf mis-suf. *Filter paper* (2 x 4 ċm) titgħabba kollha bis-sustanza għat-test f'mezz xieraq u applikata fuq iż-żona tat-test u miżmuma f'kuntatt permezz ta' faxxa okklussiva għal 48 siegħa. L-għażla tal-mezz għandha tkun ġustifikata. Is-solidi jiġu pulverizzati b'mod fin u inkorporati f'mezz xieraq. Il-likwidi jistgħu jiġu applikati mingħajr taħlit bl-ilma jekk inhu xieraq.

Jum 6-8 grupp ta' kontroll

Iż-żona tat-test terġa' titnaddaf mis-suf. Il-mezz biss huwa applikat b'mod simili liż-żona tat-test u miżmum f'kuntatt permezz ta' faxxa okklussiva għal 48 siegħa.

1.5.1.3.2. It-tħaqqieq

Jum 20-22 gruppi ta' kontroll trattati

Il-ġenbejn huma trattati u l-annimali tal-kontroll huma mnaddfa mix-xagħar. Biċċa jew kapsula li jkun fiha s-sustanza tat-test hija applikata ma' wieħed mill-ġnub ta' l-annimali ittratati u l-biċċa jew il-kapsula mil-mezz biss mal-ġemb l-ieħor. Il-biċċiet huma miżmuma b'faxxa okklussiva għal 24 siegħa.

L-osservazzjoni u l-iggradar: gruppi ta' kontroll trattati

— Bejn wieħed u ieħor 21 siegħa wara t-tneħħija tal-biċċa, iż-żona mħaqqa hija mnaddfa u kklippjata u/jew imqaxxra u depilata jekk ikun meħtieġ,

— Bejn wieħed u ieħor 3 sigħat wara (bejn wieħed u ieħor 48 siegħa mill-bidu ta' l-applikazzjoni tat-tħaqqieq) ir-reazzjoni tal-ġilda hija osservata u rrekordjata skond il-gradi li jidhru fl-appendiċi;

— Bejn wieħed u ieħor 24 siegħa wara din l-osservazzjoni, it-tieni osservazzjoni (72 siegħa) hija mwettqa u rrekordjata għal darb'oħra.

Il-qari bl-addoċċ ta' l-annimali ta' kontroll u tat-test huwa nkuraġġit.

Sabiex ikunu kjarifikati r-riżultati miksuba fl-ewwel tħaqqieqa, t-tieni tħaqqieqa, fejn hu xieraq mal-grupp tal-kontroll ġdid, għandha tkun meqjusa madwar ġimgha minn wara l-ewwel waħda. Tħaqqieq għat-tieni darba jista' jsir ukoll fuq il-grupp ta' kontroll oriġinali.

▼B

Ir-reazzjoni kollha tal-ġilda f'xi sejbiet mhux tas-soltu inklużi r-reazzjonijiet sistematiċi li jirriżultaw mill-proċeduri ta' l-induzzjoni u tat-tħaqqieq għandhom ikunu osservati u rrekordjati skond l-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman (Ara l-appendiċi). Proċeduri oħra, eż. L-eżaminazzjoni ħistopatoloġika, il-kejl tal-ħxuna tat-tinja tal-ġilda, tista' titwettaq sabiex jiġu ċċarati ir-reazzjonijiet dubbjużi.

1.5.2. *It-test Buehler*

1.5.2.1. P r e p a r a z z j o n i j i e t

Fniek ta' l-indi albino, żgħażagħ u b'saħħithom jadattaw għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju 5 ijiem qabel it-test. Qabel it-test, l-annimali jinġabru kif jinzerta u assenjati għall-gruppi ta' trattament. Il-pil jitneħħa billi jiġi kklippjat, imqaxxar jew possibilment depilat kimikament skond il-metodu tat-test użat. Għandha tingħata attenzjoni sabiex tkun evitata li ssir xi ħsara lill-ġilda. L-annimali jintiżnu qabel ma jibda t-test u fi tmiemu.

1.5.2.2. I l - k u n d i z z j o n i j i e t t a t - t e s t

1.5.2.2.1. L-annimali għat-test

Razez tal-fniek ta' l-indi albino normalment użati fil-laboratorju huma utlizzati.

1.5.2.2.2. Numru u sess.

Annimali maskili u/jew femminili jistgħu jintużaw. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma welldu u li mhumiex tqal.

Minimu ta' 20 annimal huma użati fil-grupp ittrattat u mill-anqas 10 fil-grupp tal-kontroll.

1.5.2.2.3. Il-livelli tad-doża

Għal kull stadju ta' l-induzzjoni, il-konċentrazzjonini tas-sustanza tat-test hija aġġustata għal-ogħla livell possibbli biex tipproduċi irritazzjoni ħafifa imma mhux eċċessiva. Il-konċentrazzjoni mħaqqa għandha tkun il-massimu tad-doża mhux irritanti. Jekk ikun meħtieġ il-konċentrazzjonini xierqa tista' tiġi determinata minn studju pilota bl-użu ta' żewġ jew tliet annimali.

Għall-materjali tat-test li jinħallu fl-ilma, huwa xieraq li jintuża l-ilma jew soluzzjoni mħallta bl-ilma li ma tikkawżax irritazzjoni ta' *surfactant* bħala l-mezz. Għal materjali tat-test oħra 80 % ta' l-etanol/l-ilma huwa preferut għall-induzzjoni u t-tħaqqieq ta' l-*acetone.*

1.5.2.3. I l - p r o ċ e d u r a

1.5.2.3.1. L-induzzjoni

Jum 0 – il-grupp trattat

Ġenb wieħed huwa mnaddaf mill-pil (ikklippjat). Is-sistema tal-biċċa għat-test għandha titgħabba tajjeb bis-sustanza għat-test f'mezz xieraq (l-għażla tal-mezz għandha tkun ġustifikata; is-sustanzi għat-test likwidi jistgħu jiġu applikati mingħajr ma jitħalltu bl-ilma, jekk ikun xieraq).

Is-sistema tal-biċċa għat-test hija applikata fuq iż-żona tat-test u miżmuma f'kuntatt permezz ta' biċċa okklussiva jew kapsula u faxxa xierqa għal 6 sigħat.

▼B

Is-sistema tal-biċċa għat-test trid tkun okklussiva. Biċċa tal-qoton hija adattata u tista' tkun tonda jew kwadra, iżda għandha tkun bejn wieħed u ieħor minn 4-6 cm^2. Iż-żamma permezz ta' żamma xierqa hija preferuta sabiex tiżgura l-okklużjoni. Jekk jiġi użat it-tqarwis, espożizzjonijiet addizzjonali jistgħu jkunu meħtieġa.

Jum 0 – il-grupp tal-kontroll

Ġenb wieħed huwa mnaddaf mill-pil (bl-ikklippjar). Il-mezz biss huwa applikat b'manjera simili bħal dik għall-grupp trattat. Is-sistema tal-biċċa għat-test tinżamm f'kuntatt mal-ġilda b'biċċa jew kapsula oklussiva u faxxa xierqa għal 6 sigħat. Jekk jista' jintwera li grupp ta' kontroll falz mhux meħtieġ, jista' jintuża grupp ta' kontroll naive.

Jiem 6-8 u 13-15 – il-grupp ta' kontroll trattat

Titwettaq l-istess applikazzjoni bħal fil-jum 0 fuq l-istess żona għat-test (nadifa mill-pil jekk ikun meħtieġ) tal-ġenb fil-jum 6-8, u għal darb'oħra fil-jum 13-15.

1.5.2.3.2. It-tħaqqieq

Il-jum 27-29 – il-grupp ta' kontroll trattat

Il-ġenb li ma ġiex trattat ta' l-annimali ta' kontroll u trattati jitnaddaf mill-pil (bl-ikklippjar). Biċċa okklussiva jew kabina li jkun fiha l-ammont xieraq tas-sustanza għat-test tiġi applikata fil-massimu tal-konċentrazzjoni li mhix irritanti fuq il-ġenb mhux trattat ta' wara ta' l-annimali ta' kontroll u trattati.

Fejn jgħodd, biċċa okklussiva jew kabina bil-mezz biss tiġi applikata fuq il-ġenb mhux trattat ta' quddiem ta' l-annimali li huma kemm kontrollati u kemm trattati. Il-biċċiet jew kabini huma miżmuma f'kuntatt permezz ta' faxex xierqa għal 6 sigħat.

1.5.2.3.3. L-osservazzjoni u l-iggradar

— Bejn wieħed u ieħor 21 siegħa wara t-tneħħija tal-biċċa, ż-żona mħaqqa hija mnaddfa mill-pil;

— Bejn wieħed u ieħor tliet sigħat aktar tard (bejn wieħed u ieħor 30 siegħa mill-bidu ta' l-applikazzjoni tal-biċċa tat-tħaqqieq) ir-reazzjoni tal-ġilda hija osservata u rrekordjata skond il-gradi murija fl-appendiċi;

— Bejn wieħed u ieħor 24 siegħa wara l-osservazzjoni ta' 30 siegħa, (bejn wieħed u ieħor 54 siegħa wara l-applikazzjoni tal-biċċa tat-tħaqqieq) ir-reazzjonijiet tal-ġilda huma għal darb'oħra osservati u rrekordjati.

Il-qari bl-addoċċ ta' l-annimali ta' kontroll u għat-test huwa nkuraġġit.

Sabiex ikunu kjarifikati r-riżultati miksuba fl-ewwel tħaqqieqa, t-tieni tħaqqieqa, fejn hu xieraq mal-grupp tal-kontroll ġdid, għandha tkun meqjusa madwar ġimgha minn wara l-ewwel waħda. Tħaqqieq għat-tieni darba jista' jsir ukoll fuq il-grupp ta' kontroll oriġinali.

▼B

Ir-reazzjoni kollha tal-ġilda f'xi sejbiet mhux tas-soltu inklużi r-reazzjonijiet sistematiċi li jirriżultaw mill-proċeduri ta' l-induzzjoni u tat-tħaqqieq għandhom ikunu osservati u rrekordjati skond l-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman (Ara l-appendiċi). Proċeduri oħra, eż. L-eżaminazzjoni ħispatoloġika, il-kejl tal-ħxuna tat-tinja tal-ġilda, tista' titwettaq sabiex jiġu ċċarati ir-reazzjonijiet dubbjużi

2. **DATA (GPMT u t-test buehler)**

Id-data għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull annimal individwali r-reazzjonijiet tal-ġilda għal kull perjodu ta' l-osservazzjoni.

3. **RAPPURTAĠĠ (GPMT u t-test Buehler)**

Jekk l-i*screening* isir qabel it-test fuq il-fenek ta' l-Indi, id-deskrizzjoni jew ir-referenza tat-test (eż. It-Test ta' l-Infiħ tal-Widnejn tal-Ġurdien (TIWĠ), inklużi d-dettalji tal-proċedura, iridu jingħataw flimkien mar-riżultati miksuba mas-sustanzi tat-test u tar-referenza.

Rapport tat-test (GPMT u t-test Buehler)

Ir-rapport tat-test għandu, jekk inhu possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Annimali għat-test:

— ir-razza tal-fniek ta' l-indi użata;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— is-sors. Il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew. Id-dieta eċċ.;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test u fi tmiemu.

Il-kundizzjonijiet tat-test

— it-teknika tal-preparazzjoni taż-żona tal-biċċa;

— id-dettalji tal-materjali tal-biċċa użati u t-teknika tal-biċċa;

— ir-riżultat ta' l-istudju pilota bil-konklużjoni fuq l-induzzjoni u l-konċentrazzjonijiet tat-tħaqqieq li jridu jintużaw fit-test;

— id-dettalji tal-preparazzjoni tas-sustanza għat-test, l-applikazzjoni u t-tneħħija;

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;

— il-mezz u l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza għat-test użati għall-induzzjoni u l-espożizzjonijiet tat-tħaqqieq u l-ammont totali tas-sustanza applikata għall-induzzjoni u għattħaqqieq.

Ir-riżultati:

— taqsira tar-riżultati ta' l-aħħar ċekkjatura għas-sensittività u għall-kredibilità (ara 1.3) inkluża l-informazzjoni fuq is-sustanza, il-konċentrazzjoni u l-mezz użat;

▼B

— ta’ kull annimal inkluża s-sistema ta’ gradazzjoni;

— deskrizzjoni narrativa ta’ l-effetti tan-natura u tal-gradi osservati;

— kwalunkwe sejbiet hispatoloġiċi.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

Dan il-metodu huwa analogu għal OECD TG 406

▼B

Appendiċi

TABELLA

L-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman għall-evalwazzjoni tat-test għar-reazzjonijiet tal-biċċa tat-tħaqqieq

0 = l-ebda bidla ċara

1 = *erythema* moderata jew fi dbabar

2 = *erythema* moderata u konfluwenti

3 = *erythema* intensa u nefħa

▼M4

B.7. STUDJU DWAR IT-TOSSIĊITÀ ORALI TA' DOŻA RIPETUTA KULL 28 JUM FIR-RODITURI

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test 407 (2008) tal-OECD. Il-Linja Gwida tat-Test 407 oriġinali kienet adottata fl-1981. Fl-1995 kienet adottata verżjoni riveduta, biex tinkiseb informazzjoni addizzjonali mill-annimal użat fl-istudju, b'mod partikolari dwar in-newrotossiċità u l-immunotossiċità.

2. Fl-1998, l-OECD bdiet attività ta' prijorità kbira, biex tirrevedi l-Linji Gwida tat-Testijiet eżistenti u biex tiżviluppa Linji Gwida tat-Testijiet ġodda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (8). Element wieħed tal-attività kien li tkun aġġornata l-linja gwida eżistenti tal-OECD għal "studju dwar it-tossiċità orali ta' doża ripetuta kull 28 jum fir-rodituri" (TG 407) b'parametri adatti biex tkun individwata attività endokrinali ta' kimiċi għall-ittestjar. Din il-proċedura għaddiet minn programmm internazzjonali estensiv biex tittestjata għar-rilevanza u l-prattikabbiltà tal-parametri addizzjonali, il-prestazzjoni ta' dawn il-parametri għal kimiċi b'attività (anti)estroġenika, (anti)androġenika u (anti)tirojde, l-intra- u l-inter-riproduċibbiltà tal-laboratorju u l-interferenza tal-parametri l-ġodda ma' dawk meħtieġa mit-TG 407 ta' qabel. L-ammont kbir ta' dejta li nkisbet b'hekk kienet ikkompilata u evalwata fid-dettall f'rapport komprensiv tal-OECD (9). Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 aġġornat (bħala ekwivalenti għat-TG 407) huwa r-riżultat tal-esperjenza u r-riżultati miksubin matul il-programmm tat-test internazzjonali. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jippermetti li ċerti effetti medjati mis-sistema endokrinali jitqiegħdu f'kuntest ma' effetti tossikoloġiċi oħra.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kimika, id-determinazzjoni ta' tossiċità orali bl-uzu ta' dożi ripetuti tista' ssir wara li tkun inkisbet l-informazzjoni inizjali dwar it-tossiċità bl-ittestjar ta' tossiċità akuta. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa maħsub biex ikunu investigati l-effetti fuq varjetà wiesgħa ħafna ta' miri potenzjali ta' tossiċità. Jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalgħu minn espożizzjoni ripetuta tul perjodu ta' żmien relattivament qasir, inklużi effetti fuq is-sistema nervuża, immunitarja u endokrinali. Dwar dawn il-punti ta' tmiem partikolari, għandu jidentifika kimiċi b'potenzjal newrotossiku, li jistgħu jagħtu lok għal investigazzjoni ulterjuri fil-fond ta' dan l-aspett, u kimiċi li joħolqu interferenza fil-fiżjoloġija tat-tirojde. Jista' jipprovdi wkoll dejta dwar kimiċi li jaffettwaw l-organi riproduttivi tar-raġel u/jew tal-mara f'annimali adulti żgħażagħ u jista' jagħti indikazzjoni tal-effetti immunoloġiċi.

4. Ir-riżultati minn dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 għandhom jintużaw għall-identifikazzjoni ta' perikli u l-valutazzjoni tar-riskju. Ir-riżultati miksubin mill-parametri relatati mal-endokrinali għandhom jitqiesu fil-kuntest tal-"Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi li Jqallbu l-Endokrinali" (11). Il-metodu jinkuldi l-istudju dwar id-doża bażika ripetuta ta' tossiċità li jista' jintuża għal kimiċi li dwarhom ma jkunx jista' jsir studju ta' 90 jum (eż. meta l-volum tal-produzzjoni ma jkunx jeċċedi ċerti limiti) jew bħala preliminari għal studju fit-tul. Id-durata tal-espożizzjoni għandha tkun ta' 28 jum.

▼M4

5. Il-programm internazzjonali imwettaq skont il-validazzjoni ta' parametri adatti biex potenzjalment tinstab attività endokrinali ta' kimika għall-ittestjar wera li l-kwalità tad-dejta miksuba b'dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 tkun tiddependi ħafna mill-esperjenza mil-laboratorju tat-test. Dan jirrelata speċifikatament għad-determinazzjoni istopatoloġika ta' bidliet ċikliċi fl-organi riproduttivi tal-mara u għad-determinazzjoni tal-piż tal-organi żgħar dipendenti mill-ormoni li jkunu diffiċli jiġu ddissektjati. Ġiet żviluppata gwida dwar l-istopatoloġija (19). Hija disponibbli fuq is-sit tal-Internet pubbliku tal-OECD dwar il-Linji Gwida tat-Testijiet. Hija maħsuba biex tassisti lill-patoloġisti fl-eżamijiet tagħhom u tgħin biex tiżdied is-sensittività tal-analiżi. Varjetà ta' parametri nstab li kienu indikattivi ta' tossiċità relatata mal-endokrinali u ġew inkorporati fil-Metodu ta' Ttestjar. Parametri li għalihom kienet disponibbli dejta insuffiċjenti bħala prova ta' utilità jew li wrew biss evidenza dgħajfa fil-programm ta' validazzjoni tal-kapaċità tagħhom biex jgħinu fid-detezzjoni tal-interferenti endokrinali huma proposti bħala punti tat-tmiem fakultattivi (ara Appendiċi 2).

6. Abbażi ta' dejta ġġenerata fil-proċess ta' validazzjoni, għandu jkun enfasizzat li s-sensittività ta' din l-analiżi mhix suffiċjenti biex tidentifika s-sustanzi kollha b'modalitajiet ta' azzjoni (anti)androġeniċi jew (anti)estroġeniċi (9). Il-Metodu ta' Ttestjar ma jsirx fi stadju tal-ħajja li jkun l-aktar sensittiv għal taqlib endokrinali. Il-Metodu ta' Ttestjar, madankollu, matul il-proċess ta' validazzjoni identifika sustanzi li kienu jaffettwaw b'mod dgħajjef u b'saħħtu l-funzjoni tat-tirojde, u sustanzi endokrinali attivi f'saħħithom u moderati li kienu qed jaġixxu permezz ta' reċetturi ta' estroġenu jew androġenu, iżda kważi fil-każijiet kollha naqas milli jidentifika sustanzi endokrinali attivi li b'mod dgħajjef jaffettwaw reċetturi ta' estroġenu jew androġenu. Għalhekk ma jistax ikun deskritt bħala analiżi ta' tgħarbil għal attività endokrinali.

7. Konsegwentement, in-nuqqas ta' effetti relatati ma' dawn il-modalitajiet ta' azzjoni ma jistax jitqies bħala evidenza għan-nuqqas ta' effetti fuq is-sistema endokrinali. Fir-rigward tal-effetti medjati mis-sistema endokrinali, il-karatterizzazzjoni ta' sustanzi m'għandhiex, għalhekk, tkun ibbażata fuq ir-riżultati ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar waħdu iżda għandha tkun użata f'approċċ ta' piż ta' evidenza li jinkorpora d-dejta kollha eżistenti dwar kimika biex tkun ikkaratterizzata attività endokrinali potenzjali. Għal din ir-raġuni, it-teħid regolatorju tad-deċiżjonijiet dwar attività endokrinali (karatterizzazzjoni ta' sustanzi) għandu jkun approċċ fuq bażi wiesgħa, li ma jistrieħx biss fuq riżultati minn applikazzjoni ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

8. Huwa rrikonoxxut li l-proċeduri kollha bbażati fuq l-annimali jkunu konformi ma' standards lokali ta' kura tal-annimali; id-deskrizzjonijiet ta' kura u trattament li jinsabu ħawn taħt huma standards minimi ta' prestazzjoni, u għandhom jeħdulhom posthom regolamenti lokali jekk ikunu aktar stretti. Gwida ulterjuri dwar it-trattament uman tal-annimali tingħata mill-OECD (14).

9. Id-definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Il-kimika għall-ittestjar hija amministrata oralment kuljum f'doži gradwati lil diversi gruppi ta' annimali għall-esperimenti, b'livell ta' doża waħda għal kull grupp għal perjodu ta' 28 jum. Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib, kull jum għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu bl-ewtanasja matul it-test issirilhom awtopsja u fit-tmiem tat-test l-annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu bl-ewtanasja u ssirilhom awtopsja. Studju ta' 28 jum jipprovdi informazzjoni

▼M4

dwar l-effetti ta' espożizzjoni orali ripetuta u jista' jindika l-ħtieġa ta' aktar studji ta' aktar tul ta' żmien. Jista' jipprovdi wkoll informazzjoni dwar l-għażla ta' konċentrazzjonijiet għal studji ta' aktar tul ta' żmien. Id-dejta derivata mill-użu tal-Metodu ta' Ttestjar għandha tippermetti l-karatterizzazzjoni tat-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar, għall-indikazzjoni tar-reazzjoni tad-doża u d-determinazzjoni tal-Livell Bla Effett Ħażin Osservat (NOAEL).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi ta' annimali

11. L-ispeċi preferuta ta' rodituri huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' rodituri. Għandha tingħata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f'dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 ikunu investigati fi speċijiet oħra ta' rodituri. Għalkemm huwa bijoloġikament plawżibbli li speċijiet oħra għandhom jirrispondu għal sustanzi tossiċi bl-istess mod bħall-far, l-użu ta' speċijiet iżgħar jista' jirriżulta f'aktar varjabbiltà minħabba sfidi tekniċi ta' dissektjar ta' organi iżgħar. Fil-programm internazzjonali ta' validazzjoni għad-detezzjoni ta' interferenti endokrinali, il-far kien l-unika speċi użata. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx jkunu tqal. Għandu jinbeda dożaġġ malli jkun fattibbli wara l-ftim, u, f'kull każ, qabel ma l-annimali ikollhom disa' ġimgħat. Malli jinbeda l-istudju l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati għandha tkun minima u m'għandhiex taqbeż ± 20 % tal-piż medju taż-żewġ sessi. Meta tingħata doża orali ripetuta bħala preliminari għal studju ta' aktar fit-tul, ikun preferibbli li l-annimali mill-istess razza u sors jintużaw fiż-żewġ studji.

Abitazzjoni u għalf

12. Il-proċeduri kollha għandhom ikunu konformi ma' standards lokali tal-kura tal-annmali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma tkunx aktar minn 70 % għajr għal matul il-ħasil tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, billi l-fotoperjodu jkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Fir-rigward tal-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-ħtieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta' kimika għall-ittestjar meta tkun amministrata b'dan il-metodu. L-annimali għandhom jabitaw bħala grupp fi gruppi żgħar tal-istess sess; l-annimali jistgħu jabitaw individwalment jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Għal gruppi f'gaġeġ, m'għandux ikun hemm aktar minn ħames annimali jabitaw f'gaġġa waħda.

13. L-għalf għandu jkun analizzat regolarment għall-kontaminanti. Għandu jinżamm kampjun tad-dieta sakemm ikun iffinalizzat ir-rapport.

Preparazzjoni tal-annimali

14. L-annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minħabba t-tqegħid tal-gaġeġ. L-annimali għandhom ikunu identifikati individwalment u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju tat-trattament biex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Preparazzjoni ta' doži

15. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b'gavage (bil-forza) jew mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb. Il-metodu ta' amministrazzjoni orali jkun jiddependi mill-għan tal-istudju, u mill-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi/tossikokinetiċi tal-kimika għall-ittestjar.

▼M4

16. Meta jkun meħtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinħall jew tiġi sospiża f'vejjikolu adattat. Huwa rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel għandu jitqies l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni fl-ilma, segwit minn konsiderazzjoni ta' soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b'soluzzjoni f'vejjikoli oħra. Għal vejjikoli oħra minbarra ilma l-karatteristiċi tossiċi tal-vejjikolu għandhom ikunu magħrufa. L-istabbiltà tal-kimika għall-ittestjar fil-vejjikolu għandha tkun iddeterminata.

PROĊEDURA

Għadd u sess tal-annimali

17. Mill-anqas 10 annimali (ħames nisa u ħames irġiel) għandhom ikunu użati fil-livell ta' kull doża. Jekk tkun ippjanata ewtanasja interim, l-għadd għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimalii li jinqatlu bl-ewtanasja qabel jitlesta l-istudju. Għandha tingħata konsiderazzjoni għal grupp satellitarju addizzjonali ta' għaxar annimali (ħamsa għal kull sess) fil-grupp ta' kontroll u f'dak tad-doża l-aktar għolja għall-osservazzjoni ta' riversibbiltà, persistenza jew okkorrenza mdewma ta' effetti tossiċi, għal mill-anqas 14-il jum wara it-trattament.

Dożaġġ

18. Ġeneralment, għandhom jintużaw mill-anqas tliet gruppi ta' test u grupp ta' kontroll, iżda jekk minn valutazzjoni ta' dejta oħra, ma jkunu mistennija l-ebda effetti f'doża ta' 1 000 mg/kg bw/d, ikun jista' jsir test ta' limitu. Jekk ma jkun hemm l-ebda dejta adattata disponibbli, jista' jsir studju dwar tiftix ta' firxa (annimali tal-istess razza u sors) bħala għajnuna għad-determinazzjoni tad-doži li jkollhom jintużaw. Ħlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom ikunu trattati b'mod identiku bħal tas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-ogħla volum użat.

19. Il-livelli tad-doża għandhom jintgħażlu billi titqies kull dejta eżistenti dwar it-tossiċità u (tossiko-) kinetika disponibbli għall-kimika għall-ittestjar u għal kimiċi relatati. L-ogħla livell ta' doża għandu jintgħażel bil-għan li jġib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija severa. Minn hemm 'il quddiem, għandha tintgħażel sekwenza dejjem tonqos tal-livelli tad-doża biex jintwera kull rispons relatat ma' dożaġġ u l-ebda effetti ħżiena osservati fl-aktar livell baxx tad-doża (NOAEL). Intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss ikunu l-aħjar biex ikunu stabbiliti l-livelli neżlin tad-doži, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test sikwit spiss hija preferibbli milli jintużaw intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

20. Meta jkun hemm tossiċità ġenerali osservata (eż. piż tal-ġisem ridott, effetti tal-fwied, qalb, pulmun jew kliewi, eċċ.) jew tibdiliet oħra li jistgħu ma jkunux risponsi tossiċi (eż. konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensittivi immunitarji, newroloġiċi jew endokrinali għandhon ikunu interpretati b'kawtela.

Test ta' limitu

21. Jekk test b'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum jew, għall-amministrazzjoni tad-dieta jew tal-ilma tax-xorb, ta' perċentwali ekwivalenti fid-dieta, jew ta' ilma tax-xorb (abbażi ta' determinazzjonijiet ta' piż tal-ġisem), billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi osservabbli u jekk ma tkunx mistennija tossiċità bbażata fuq dejta minn kimiċi relatati strutturalment, f'dak il-każ studju sħiħ bl-użu ta' tliet livelli ta' doża jista' ma jitqisx li jkun meħtieġ. It-test ta' limitu japplika ħlief meta espożizzjoni umana tindika l-ħtieġa li jkollu jintuża livell ogħla ta' doża.

▼M4

Amministrazzjoni ta' doża

22. L-annimali jingħataw doża b'kimika għall-ittestjar kuljum 7 ijiem fil-ġimgħa għal perjodu ta' 28 jum. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b'gavage, dan għandu jsir b'doża waħda lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu tal-likwidu li jkun jista' jiġi amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet fl-ilma fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Ħlief għal kimiċi irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

23. Għall-kimiċi amministrati permezz tad-dieta jew l-ilma tax-xorb, huwa importanti jkun żgurat li l-kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta jistgħu jintużaw konċentrazzjoni kostanti ta' dieta (ppm) jew livell wieħed kostanti ta' doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimali; l-alternattiva użata għandha tkun speċifikata. Għal kimika amministrata b'gavage, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili għal kull jum, u aġġustata kif meħtieġ biex jinżamm livell wieħed kostanti ta' doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal. Meta jintuża studju ta' doża ripetuta bħala preliminari għal studju fit-tul, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

Osservazzjonijiet

24. Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun ta' 28 jum. L-annimali fi grupp satellitarju skedati għall-osservazzjonijiet ta' segwitu għandhom jinżammu għal mill-anqas 14-il jum mingħajr trattament biex tinstab okkorrenza mdewma, jew persistenza ta', jew irkupru minn effetti tossiċi.

25. Osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-anqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin(ijiet) kull jum u jkun meqjus il-perjodu massimu tal-effetti antiċipati wara dożaġġ. Il-kundizzjoni tas-saħħa tal-annimali għandha tiġi rreġistrata. Mill-anqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha jiġu osservati għall-morbiditá u l-mortalità.

26. Għal darba qabel l-ewwel espożizzjoni (biex jitħallew isiru paraguni skont is-suġġett), u mill-anqas darba fil-ġimgħa minn hemm 'il quddiem, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi dettaljati fl-annimali kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra mill-gaġġa ta' abitazzjoni f'arena standard u preferibbilment fl-istess ħin tal-jum f'kull okkażjoni. Għandhom ikunu rreġistrati sewwa, preferibbilment billi jintużaw sistemi ta' punti, iddefiniti espliċitament mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandu jsir sforz biex ikun żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test ikunu minimi u li l-osservazzjonijiet preferibbilment jitmexxew minn osservaturi li ma jkunux jafu bit-trattament. Sinjali nnotati għandhom jinkludu, iżda ma jkunux limitati għal, bidliet fil-ġilda, pil, għajnejn, membrani mukuża, okkorrenza ta' sekrezzjonijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż. dmugħ, erezzjoni tal-pil, daqs tal-pupilli, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Bidliet fil-mixja, qagħda u rispons għal immaniġġar, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv) jew imġiba biżarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (2).

27. Fir-raba' ġimgħa ta' espożizzjoni għandhom isiru valutazzjoni tar-reattività sensorja għal stimuli ta' tipi differenti (2) (eż. stimuli tas-smigħ, viżivi u proprjoċettivi) (3)(4)(5), valutazzjoni tal-qawwa tal-qabda (6) u tal-attività motorja (7). Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda, jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi.

▼M4

28. Osservazzjonijiet funzjonali magħmulin fir-raba' ġimgħa ta' espożizzjoni jistgħu jitħallew barra meta l-istudju jsir bħala studju preliminari għal studju subkroniku (ta' 90 jum) sussegwenti. F'dak il-każ, l-osservazzjonijiet funzjonali għandhom ikunu inklużi f'dan studju ta' segwitu. Min-naħa l-oħra, id-disponibbiltà ta' dejta dwar osservazzjonijiet funzjonali mill-istudju ta' doża ripetuta tista'ssaħħaħ il-kapaċità biex jintgħażlu dożi għal studju subkroniku sussegwenti.

29. Bħala eċċezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu wkoll jitħallew barra għal gruppi li xort'oħra juru sinjali ta' tossiċità tant li tfixkel b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.

30. F'awtopsja, iċ-ċiklu estruż tan-nisa kollha jista' jiġi ddeterminat (b'mod fakultattiv) billi jittieħdu tiċpisiet (smears) vaġinali. Dawn l-osservazzjonijiet se jipprovdu informazzjoni dwar l-istadju taċ-ċiklu estruż meta jsir il-qtil u jgħinu fl-evalwazzjoni istoloġika ta' tessuti sensittivi tal-estroġenu [ara l-gwida dwar l-istopatoloġija (19)].

Piż tal-ġisem u konsum tal-ikel/ilma

31. L-annimali kollha għandhom jintiżnu mill-anqas darba fil-ġimgħa. Il-kejlijiet tal-konsum tal-ikel għandu jsir mill-anqas kull ġimgħa. Jekk il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu wkoll jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa.

Ematoloġija

32. L-eżamijiet ematoloġiċi li ġejjin għandhom isiru fit-tmiem tal-perjodu tat-test: ematokrit, konċentrazzjonijiet tal-emoglobina, għadd ta' eritroċiti, retikuloċiti, għadd totali u differenzjali ta' lewkoċiti, għadd ta' pjastrini u kejl ta' ħin/potenzjal għal emboliżmu. Determinazzjonijiet oħra li għandhom isiru, jekk il-kimika għall-ittestjar jew il-metaboliti putattivi tagħha jkollhom jew ikunu ssuspettati li jkollhom proprjetajiet ossidanti, jinkludu konċentrazzjoni ta' metemoglobina u l-korpi ta' Heinz.

33. Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn sit imsemmi eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtanasja tal-annimali, u għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. L-annimali għandhom jinżammu msajmin tul il-lejl qabel l-ewtanasja ([1]).

Bijokimika klinika

34. Id-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika għall-investigazzjoni tal-effetti tossiċi maġġuri f'tessuti u, speċifikatament, ta' effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demm miksubin mill-annimali kollha eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtanasja tal-annimali (minbarra dawk misjubin moribondi u/jew li jinqatlu bl-ewtanasja qabel ma jintemm l-istudju). Investigazzjonijiet ta' plażma jew serum għandhom jinkludu sodju, potassju, glukożju, kolesterol totali, urea, kreatinina, proteina totali u albumina, mill-anqas żewġ enzimi indikattivi ta' effetti epatoċellulari (bħal alanin aminotransferaži, aspartate aminotransferaži, fosfataži alkalina, γ-glutamil trans-peptidase u glutamat ta' deidroġenaži), u aċidi tal-biljari. Il-kejl ta' enzimi addizzjonali (ta' oriġini epatika jew oriġinijiet oħra) u ta' bilirubina jistgħu jipprovdu informazzjoni utli f'ċerti ċirkostanzi.

35. B'mod fakultattiv, id-determinazzjonijiet ta' analiżi tal-awrina jistgħu jsiru matul l-aħħar ġimgħa tal-istudju bl-użu ta' ġbir ta' volum ta' awrina li jkun ittaħdilha l-ħin; dehra, volum, ożmolalità jew gravità speċifika, pH, proteina, glukożju u demm/ċelluli tad-demm.

([1]) Għal għadd ta' kejlijiet ta' serum u plażma, l-aktar għall-glukożju, is-sawm tul il-lejl ikun ippreferut. Ir-raġuni ewlenija għal din il-preferenza hija li aktar varjabbiltà li għandha inevitabbilment tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, għandha tendenza li taħbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċli. Min-naħa l-oħra, iżda, is-sawm tul il-lejl jista' joħloq interferenza fil-metaboliżmu ġenerali tal-annimali u, partikolarment fl-istudji dwar l-għalf, jista' jiddisturba l-espożizzjoni ta' kuljum għall-kimika għall-ittestjar. Jekk ikun adottat sawm tul il-lejl, id-determinazzjonijiet bijokimiċi kliniċi għandhom isiru wara li jkunu twettqu l-osservazzjonijiet funzjonali fir-raba' (4) ġimgħa tal-istudju.

▼M4

36. Flimkien ma' dan, għandhom jitqiesu studji biex ikunu investigati markaturi ta' plażma jew serum ta' ħsara ġenerali għal tessuti. Determinazzjonijiet oħra li għandhom isiru, jekk il-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar ikunu jistgħu jew ikunu ssuspettati li jaffettwaw profili metaboliċi relatati, jinkludu kalċju, fosfat, trigliċeridi, ormoni speċifiċi u kolinesteraži. Dawn jeħtiġilhom ikunu identifikati għal kimiċi f'ċerti klassijiet jew abbaži ta' każ każ.

37. Għalkemm fl-evalwazzjoni internazzjonali tal-punti ta' tmiem relatati mal-endokrinali ma setax jintwera vantaġġ ċar għad-determinazzjoni tal-ormoni tat-tirojde (T3, T4) u TSH, jista' jkun utli li jinżammu kampjuni ta' plażma jew serum biex jitkejlu T3, T4 u TSH (fakultattivi) jekk ikun hemm indikazzjoni ta' effett fuq l-assi pitwitarja-tirojde. Dawn il-kampjuni jistgħu jkunu ffriżati f'- 20° għall-ħżin. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-konċentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:

— il-ħin tal-qatla minħabba varjazzjonijiet tul il-jum tal-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— il-metodu tal-qatla biex tkun evitata tensjoni bla bżonn għall-annimali li tista' taffettwa l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni

— is-settijiet tat-testijiet għad-determinazzjonijiet tal-ormoni li jistgħu jkunu differenti mill-kurvi standard tagħhom.

L-identifikazzjoni definittiva ta' kimiċi tat-tirojde attiva hija l-aktar affidabbli b'analiżi istopatoloġika milli bil-livelli tal-ormoni.

38. Kampjuni ta' plażma maħsubin speċifikatament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f'ħin komparabbli tal-jum. Huwa rrakkomandat li tingħata konsiderazzjoni lid-determinazzjonijiet ta' T3, T4 u TSH mibdija bbażati fuq alterazzjonijiet ta' istopatoloġija tat-tirojde. Il-valuri numeriċi miksubin meta jkunu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta' analiżi kummerċjali. Għaldaqstant, jista' ma jkunx possibbli li jkunu pprovduti kriterji ta' prestazzjoni bbażati fuq dejta storika uniformi. Alternattivament, il-laboratorji għandhom jagħmlu sforzi biex iżommu koeffiċjenti ta' kontroll ta' varjazzjoni taħt 25 għal T3 u T4 u taħt 35 għal TSH. Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom ikunu rreġistrati f'ng/ml.

39. Jekk bażi tad-dejta storika ma tkunx adegwata, għandha tingħata konsiderazzjoni lid-determinazzjoni ta' varjabbli ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel ma jibda d-dożaġġ jew preferibbilment f'sett ta' annimali mhux inklużi fil-gruppi ta' esperimenti.

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

40. L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-testikoli, l-epididimi, il-prostata + il-bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni kollha flimkien, it-timu, il-milsa, il-moħħ u l-qalb tal-annimali kollha (minbarra ta' dawk misjubin moribondi u/jew li jinqatlu bl-ewtanasja qabel ma intemm l-istudju) għandhom jintraqmu minn kull tessut imwaħħal magħhom, kif jixraq, u l-piż tagħhom fl-imxarrab għandu jittieħed malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni biex ikun evitat it-tnixxif. Għandha tkun eżerċitata attenzjoni meta jsir it-tirqim tal-kumpless tal-prostata biex ikun evitat li jittaqqbu l-bżieżaq seminali mimlijin fluwidu. Alternattivament, il-bżieżaq seminali u l-prostata jistgħu jintraqmu u jintiżnu wara l-fissazzjoni.

▼M4

41. Flimkien ma' dan, żewġ tessuti oħra jistgħu, imma mhux bilfors, jintiżnu malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni, biex ikun evitat it-tnixxif: ovarji akkoppjati (piż fl-imxarrab) u l-utru, inkluż iċ-ċerviċi (il-gwida dwar it-tneħħija u l-preparazzjoni tat-tessuti tal-utru għal-kejl tal-piż hija pprovduta fit-TG 440 tal-OECD (18)).

42. Il-piż tat-tirojde (fakultattiv) jista' jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirqim għandu jsir ukol b'reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-ħsara lit-tessut. Il-ħsara fit-tessut tista' tippreġudika analiżi istopatoloġika.

43. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati f'midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (ara l-paragrafu 47): il-leżjonijiet kbar kollha, il-moħħ (reġjuni rappreżentattivi inklużi ċ-ċerebru, iċ-ċervellett u l-mežoċefalu), in-nerv vertebrali, l-għajnejn, l-istonku, l-imsaren żgħar u kbar (inklużi l-irqajja' ta' Peyer), il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-timu, it-tirojde, it-trakea u l-pulmuni (ippreservati b'inflazzjoni b'fissattiv u wara b'immersjoni), il-gonadi (testikoli u ovarji), l-organi sesswali aċċessorji (utru u ċerviċi, epididimi, prostata u bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni), il-vaġina, il-bużżieqa tal-awrina, in-nodi limfatiċi [minbarra n-nodu ta' tisfija l-aktar qrib għandu jittieħed nodu limfatiku ieħor skont il-prassi tal-laboratorju (15)], in-nerv periferali (xjatiku jew tibjali) preferibbilment qrib ħafna tal-muskolu, il-muskolu skeletali u l-għadam, bil-mudullun tal-għadam (taqsima jew, alternattivament, aspirat tal-mudullun tal-għadam imqiegħed frisk). Huwa rrakkomandat li t-testikoli jkunu ffissati b'immersjoni f'fissattiv ta' Bouin jew f'dak modifikat ta' Davidson (16) (17). It-tunika albuġinea għandha tittaqqab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b'labra biex jitħalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar.

44. It-tessuti li ġejjin jistgħu jagħtu indikazzjoni siewja tal-effetti relatati mal-endokrinali: Il-gonadi (ovarji u testikoli), organi sesswali aċċessorji (l-utru inkluż iċ-ċerviċi, l-epididimi, il-bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni, il-prostata dorsolaterali u l-ventrali), il-vaġina, il-pitwitarja, il-glandola mammarja tar-raġel, il-glandola tirojde u l-adrenali. Il-bidliet fil-glandoli mammarji tar-raġel ma kinux iddokumentati b'mod suffiċjenti iżda dan il-parametru jista' jkun sensittiv ħafna għal sustanzi b'azzjoni estroġenika. L-osservazzjoni ta' organi/tessuti li mhumiex elenkati fil-paragrafu 43 hija fakultattiva (ara l-Appendiċi 2).

45. Il-Gwida dwar l-istopatoloġija (19) tagħti aktar informazzjoni dwar id-dissezzjoni, fissazzjoni, tqassim f'taqsimiet u l-istopatoloġija ta' tessuti endokrinali.

46. Fil-programmm tat-test internazzjonali nkisbet xi evidenza li effetti endokrinali sottili minn kimiċi b'qawwa baxxa biex jaffettwaw l-omeostaži tal-ormon sesswali jistgħu jkunu identifikati bid-disturb tas-sinkronizzazzjoni taċ-ċiklu estruż f'tessuti differenti u mhux daqshekk b'alterazzjonijiet istopatoloġiċi sfaċċati f'organi sesswali tal-mara. Għalkemm ma nkisbet l-ebda prova definittiva għall-effetti bħal dawn, huwa rrakkomandat li evidenza ta' asinkronija li jista' jkun hemm taċ-ċiklu estruż għandha titqies fl-interpretazzjoni tal-istopatoloġija tal-ovarji (ċelluli follikulari, tekali u mrammlin), tal-utru, taċ-ċerviċi u tal-vaġina. Jekk ikun ivvalutat, l-istadju taċ-ċiklu kif iddeterminat minn tiċpisiet vaġinali jista' jkun inkluż ukoll f'dan il-paragun.

▼M4

Istopatoloġija

47. Għandha ssir istopatoloġija sħiħa fuq l-organi u t-tessuti ppreservati tal-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doża għolja. Dawn l-eżamijiet għandhom ikunu estiżi għal annimali tal-gruppi l-oħra kollha ta' dożaġġ, jekk ikunu osservati bidliet relatati ma' trattament fil-grupp ta' doża għolja.

48. Il-leżjonijiet kbar kollha għandhom ikunu eżaminati.

49. Meta jintuża grupp satellitarju, l-istopatoloġija għandha ssir fuq tessuti u organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi ttrattati.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

50. Għandha tkun ipprovduta dejta individwali. Addizzjonalment, id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali fil-bidu tat-test, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu bl-ewtanasja għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kull mewta jew ewtanasja, l-għadd li juri sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż il-waqt meta jfaqqgħu, kemm idumu u kemm ikun sever kull effett tossiku, l-għadd ta' annimali li juru leżjonijiet, it-tip ta' leżjonijiet, is-severità tagħhom u l-perċentwali tal-annimali li juru kull tip ta' leżjoni.

51. Meta jkun possibbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-paraguni tal-effett tul firxa tad-doża għandhom jevitaw l-użu ta' testijiet-t multipli. Il-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju.

52. Għall-kontroll tal-kwalità huwa propost li tinġabar dejta storika ta' kontroll u li għad-dejta numerika jkunu kkalkulati l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni, speċjalment għall-parametri li jkollhom rabta ma' detezzjoni ta' interferent endokrinali. Din id-dejta tista' tintuża għal finijiet ta' paragun meta jkunu evalwati studji attwali.

Rapport tat-test

53. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

— natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni.

Vejjikolu (fejn xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu, jekk ma jkunx ilma.

Annimali tat-test:

— speċi/razza użata;

— għadd, età u sess tal-annimali;

— sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;

— piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

— ġustifikazzjoni għal speċi jekk ma jkunx far

Kundizzjonijiet tat-test:

— motiv għall-għażla tal-livell ta' doża;

— dettalji tal-formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta, konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;

▼**M4**

— dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— konverżjoni minn dieta/konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Punti ta' tmiem fakultattivi investigati

— lista ta' punti ta' tmiem fakultattivi investigati

Riżultati:

— piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk applikabbli;

— dejta ta' reazzjoni tossika skont is-sess u livell ta' doża, inklużi sinjali ta' tossiċità;

— natura, severità u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);

— attività sensorja, qawwa tal-qabda u valutazzjonijiet tal-attività motorja;

— testijiet ematoloġiċi b'valuri bażi rilevanti;

— testijiet ta' bijokimika klinika b'valuri linja bażi rilevanti;

— piż tal-ġisem waqt l-ewtanasja u dejta dwar il-piżijiet tal-organi;

— sejbiet minn awtopsji;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha istopatoloġiċi;

— dejta ta' assorbiment jekk disponibbli;

— trattament ta' statistika ta' riżultati, fejn jixraq.

Diskussjoni dwar riżultati.

Konklużjonijiet

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Androġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bħal ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosteron) f'organiżmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T_3) f'organiżmu mammiferu.

Dożaġġ huwa terminu ġenerali li jinkludi doża, il-frekwenza tagħha u d-durata ta' dożaġġ.

Doża hija l-ammont ta' kimika għall-ittestjar amministrata. Id-doża hija espressa bħala piż tal-kimika għall-ittestjar għal kull unità ta' piż tal-ġisem ta' annimal tat-test għal kull jum (eż. mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jew bħala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Tossiċità evidenti huwa terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun ġiet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu and għandhom ikunu tali li żieda fid-doża amministrata tista' tkun mistennija li tirriżulta fl-iżvilupp ta' sinjali ta' tossiċità estrema u probabbilment mortalità.

NOAEL hija l-abbrevjazzjoni għall-livell bla effett ħażin osservat. Dan huwa l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet ħżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minħabba trattament.

Estroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bħal ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17ß) f'organiżmu mammiferu.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Attività tat-tirojde hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bħal ormon naturali tat-tirojde (eż. T_3) f'organiżmu mammiferu.

Validazzjoni hija proċess xjentifiku mfassal biex jikkaratterizza r-rekwiżiti operattivi u l-limitazzjonijiet ta' metodu ta' ttestjar u biex juri l-affidabbiltà u r-rilevanza tiegħu għal għan partikolari.

▼M4

Appendiċi 2

Punti ta' tmiem rakkomandati għall-detezzjoni ta' interferenti endokrinali (EDs) f'dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7

Punti ta' tmiem obbligatorji	Punti ta' tmiem fakultattivi
Piż	
— Testikoli — Epididimi — Adrenali — Prostata + bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni	— Ovarji — Utru, inkluż ċerviċi — Tirojde
Istopatoloġija	
— Gonadi: — Testikoli u — Ovarji — Organi sesswali aċċessorji: — Epididimi, — Prostata + bużżieqa seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni — Utru, inkluż ċerviċi — Adrenali — Tirojde — Vaġina	— Tiċpisiet vaġinali — Glandoli mammarji tar-raġel — Pitwitarja
Kejl ta' ormoni	
	— Livelli ta' ċirkolazzjoni ta' T3, T4 — Livelli ta' ċirkolazzjoni ta' TSH

LETTERATURA:

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼M4

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.htm l

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE u Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. **TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI SUBAKUTA: STUDJU TA' 28 JUM**

SOMMARJU

Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.8 rivedut tfassal biex jikkaratterizza b'mod sħiħ it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni wara espożizzjoni ripetuta għal perjodu limitat ta' żmien (28 jum), u biex jipprovdi dejta għal valutazzjonijiet tar-riskju ta' inalazzjoni kwantitattiva. Gruppi ta' mill-anqas 5 rġiel u 5 nisa rodituri jkunu esposti 6 siġħat kuljum għal 28 jum għal a) il-kimika għall-ittestjar fi tliet livelli jew aktar ta' konċentrazzjoni, b) arja filtrata (kontroll negattiv), u/jew c) il-vejjikolu (kontroll ta' vejjikolu). L-annimali jkunu esposti ġeneralment għal 5 ijiem fil-ġimgħa iżda espożizzjoni għal 7 ijiem fil-ġimgħa hija wkoll permessa. L-iġiel u nisa jkunu dejjem ittestjati, iżda jkunu jistgħu jiġu esposti f'livelli differenti ta' konċentrazzjoni jekk ikun magħruf li sess wieħed ikun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar. Dan il-metodu jippermetti lid-direttur tal-istudju jkun flessibbli biex jinkludi gruppi satellitarji (riversibbli), ħasil tal-bronkoalveolari (BAL), testijiet newroloġiċi u patoloġija klinika addizzjonali u evalwazzjonijiet istopatoliġiċi biex it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar tkun ikkaratterizzata aħjar.

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test 412 (2009) tal-OECD. Il-Linja Gwida tat-Test 412 (TG 412) oriġinali dwar inalazzjoni subakuta kienet adottata fl-1981 (1). Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.8 (bħala ekwivalenti għat-TG 412 riveduta) kien aġġornat biex jirrifletti l-istat tax-xjenza u biex jissodisfa l-ħtiġijiet regolatorji preżenti u futuri.

2. Dan il-metodu jgħin biex ikunu kkaratterizzati effetti ħżiena wara espożizzjoni ripetuta kuljum ta' inalazzjoni għal kimika għall-ittestjar għal 28 jum. Id-dejta derivata minn studji dwar tossiċità ta' inalazzjoni subakuta tista' tintuża għal valutazzjonijiet tar-riskji kwantitattivi [jekk ma jkunux segwiti minn studju ta' 90 jum dwar tossiċità ta' inalazzjoni subkronika (Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness)]. Id-dejta tista' tipprovdi wkoll informazzjoni dwar l-għażla ta' konċentrazzjonijiet għal studji għal aktar fit-tul bħall-istudju ta' 90 jum dwar it-tossiċità ta' inalazzjoni subkronika. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux maħsub speċifikatament għall-ittestjar ta' nanomaterjali. Id-definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma pprovduti fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida 39 (2).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

3. L-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju biex tissaħħaħ il-kwalità tal-istudju u biex l-użu tal-annimali jkun mill-anqas. L-informazzjoni li għandha tassisti fl-għażla ta' konċentrazzjonijiet ta' testijiet adatti tista' tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli u dejta tossikoloġika dwar kimiċi relatati strutturalment; u dejta derivata minn ittestjar tat-tossiċità ta' inalazzjoni akuta. Jekk tkun mistennija jew osservata newrotossiċità waqt li jkun għaddej l-istudju, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jinkludi evalwazzjonijiet xierqa bħal gaġġa funzjonali ta' osservazzjoni (FOB) u kejl ta' attività motorja. Għalkemm l-għażla sewwa tal-ħin ta' espożizzjonijiet relattivi għal eżamijiet speċifiċi tista' tkun kritika, il-prestazzjoni ta' dawn l-attivitajiet addizzjonali m'għandhiex tfixkel id-disinn bażiku tal-istudju.

▼M4

4. Id-dilwizzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar korrużivi jew irritanti jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet li għandhom jirrendu l-grad mixtieq ta' tossiċità [irreferi għal GD 39 (2)]. Meta l-annimali jkunu esposti għal dawn il-materjali, il-konċentrazzjonijiet immirati għandhom ikunu baxxi biżżejjed li ma joħolqux uġigħ kbir u diffikultà, iżda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta' konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilħqu l-għan regolatorju u xjentifiku tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jintgħażlu abbażi ta' każ każ, preferibbilment imsejsa fuq studju mfassal b'mod adegwat ta' detezzjoni ta' firxa li jipprovdi informazzjoni dwar il-punt ta' tmiem kritiku, dwar kull livell limitu ta' irritazzjoni u dwar il-ħin ta' meta beda (ara l-paragrafi 11-13). Għandha tingħata l-ġustifikazzjoni għall-għażla ta' konċentrazzjoni.

5. L-annimali moribondi jew annimali li jkunu jidhru li jkunu muġugħa jew li juru sinjali ta' diffikultà severa u fit-tul għandhom jinqatlu b'mod uman. L-annimali moribondi jitqiesu bl-istess mod bħal annimali li jmutu waqt it-test. Il-kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni li jinqatlu annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu ħafna, u gwida biex ikun magħruf meta l-mewt tkun tista' titbassar jew tkun waslet qrib ħafna, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' Speċi tal-Annimali

6. Għandhom jintużaw rodituri adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi preferuta hija l-far. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw speċijiet oħra.

Preparazzjoni tal-annimali

7. Nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal. Fil-jum li fih jintgħażlu b'mod każwali, l-annimali għandhom ikunu adulti żgħażagħ li jkunu minn 7 sa 9 ġimgħat fl-età. Il-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' ±20 % tal-piż medju għal kull sess. L-annimali jintgħażlu b'mod każwali, jiġu mmarkati għal identifikazzjoni individwalment, u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 ijiem qabel ma jibda t-test biex jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Trobbija tal-annimali

8. L-annimali għandhom ikunu identifikati individwalment, jekk ikun possibbli bi transponders taħt il-ġilda, biex ikunu ffaċilitati l-osservazzjonijiet u tkun evitata l-konfużjoni. It-temperatura tal-kamra ta' manutenzjoni tal-annimali esperimentali għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara l-espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-għadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull annimal u għandu jimminimizza t-telf minħabba kannibaliżmu u ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieħer biss, jista' jkun jeħtiġilhom jidraw it-tubi ta' trażżin. It-tubi ta' trażżin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusklu. Jekk tkun disponibbli dejta ġenerika li turi li ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa ċertu limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx meħtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trażżin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jitħallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' xħabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, ħlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

▼M4

Kmamar tal-inalazzjoni

9. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-oġġett tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-modalità ppreferuta ta' espożizzjoni hija mill-imnieħer biss (liema fraži tinkludi r-ras biss, l-imnieħer biss, jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieħer biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu aħjar billi tintuża modalità ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu, iżda dan għandu jkun iġġustifikat fir-rapport tal-istudju. Biex tkun żgurata stabbiltà tal-atmosfera meta tintuża kamra għall-ġisem kollu, "il-volum" totali tal-annimali tat-test m'għandux ikun aktar minn 5 % tal-volum tal-kamra. Il-prinċipji ta' tekniki ta' espożizzjoni mill-imnieħer biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma indirizzati f'GD 39 (2).

STUDJI DWAR IT-TOSSIĊITÀ

Konċentrazzjonijiet limitati

10. B'differenza minn studji akuti, m'hemmx konċentrazzjonijiet limitati ddefiniti fi studji ta' 28 jum dwar tossiċità ta' inalazzjoni subakuta. Il-konċentrazzjoni massima ttestjata għandha tqis: 1) il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb, 2) il-livell ta' "l-agħar każ" ta' espożizzjoni umana, 3) il-ħtieġa li tinżamm provvista adegwata ta' ossiġenu, u/jew 4) konsiderazzjonijiet ta' trattament xieraq tal-annimali. Fin-nuqqas ta' limiti abbażi ta' dejta, jistgħu jintużaw il-limiti akuti tar-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (13) (jiġifieri sa konċentrazzjoni massima ta' 5 mg/l għal aerosols, 20 mg/l għal fwar u 20 000 ppm għal gassijiet); irreferi għal GD 39 (2). Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk ikun meħtieġ li dawk il-limiti jinqabżu meta jkunu ttestjati gassijiet jew kimiċi għall-ittestjar volatili ħafna (eż. refriġeranti). Il-konċentrazzjoni limitata għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolqot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

Studju dwar id-Detezzjoni ta' Firxa

11. Qabel ma jingħata bidu għall-istudju ewlieni, jista' jkun meħtieġ li jsir studju dwar l-detezzjoni ta' firxa. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa huwa aktar komprensiv minn studju ta' osservazzjoni minħabba li mhux limitat għal għażla ta' konċentrazzjonijiet. It-tagħlim li hemm x'wieħed jieħu minn studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jwassal biex l-istudju ewlieni jirnexxi. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista', pereżempju, jipprovdi informazzjoni teknika dwar metodi analitiċi, teħid tad-daqs ta' partiċelli, sejbien ta' mekkaniżmi tossiċi, patoloġija klinika u dejta istopatoloġika u stimi ta' x'jista' jkunu konċentrazzjonijiet ta' NOAEL u MTC fi studju ewlieni. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża l-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa biex jidentifika l-limitu tal-irritazzjoni tas-sistema respiratorja (eż. bl-istopatoloġija tas-sistema respiratorja, l-ittestjar tal-funzjoni pulmonarja jew il-ħasil tal-bronkoalveolari), il-konċentrazzjoni ogħla li hija tollerata mingħajr tensjoni bla bżonn għall-annimali, u l-parametri li għandhom jikkaratterizzaw bl-aħjar mod it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar.

12. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jikkonsisti f'livell wieħed jew aktar ta' konċentrazzjonijiet. M'għandhomx ikunu esposti aktar minn tliet irġiel u tliet nisa f'kull livell ta' konċentrazzjoni. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa għandu jdum mill-anqas 5 ijiem u ġeneralment mhux aktar minn 14 jum. Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet għall-istudju ewlieni għandu jingħata fir-rapport ta' studju. L-għan tal-istudju ewlieni huwa li tintwera relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons ibbażata fuq dak li huwa mistenni li jkun l-aktar punt ta' tmiem sensittiv. Il-konċentrazzjoni baxxa għandha idealment tkun konċentrazzjoni ta' ebda effett ħażin osservat, filwaqt li l-konċentrazzjoni għolja għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolqot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

▼M4

13. Meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni għall-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa, l-informazzjoni kollha disponibbli għandha titqies li tinkludi relazzjonijiet ta' attività strutturata u dejta għal kimiċi simili (ara l-paragrafu 3). Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jivverifika/jirrifjuta dawk li jitqiesu li jkunu l-punti ta' tmiem l-aktar sensittivi bbażati b'mod mekkaniku, eż. inibizzjoni ta' kolinesteraži minn organofosfati, formazzjoni ta' metemoglobina minn aġenti eritroċitotossiċi, ormoni tat-tirojde (T3, T4) għal tirotossikanti, proteina, LDH, jew newtrofili f'ħasil tal-bronkoalveolari għal partiċelli li ftit jinħallu li ma jagħmlux ħsara jew aerosols li jirritaw il-pulmun.

Studju Ewlieni

14. L-istudju ewlieni dwar tossiċità subakuta ġeneralment jikkonsisti fi tliet livelli ta' konċentrazzjoni, u wkoll kontrolli konkurrenti negattivi (arja) u/jew ta' vejjikoli skont il-ħtieġa (ara l-paragrafu 17). Id-dejta kollha disponibbli għandha tkun utilizzata bħala għajnuna fl-għażla ta' livelli adatti ta' espożizzjoni, inklużi r-riżultati ta' studji sistemiċi ta' tossiċità, metaboliżmu u kinetika (għandha ssir enfaži partikolari biex ikunu evitati livelli għoljin ta' konċentrazzjoni li jissaturaw proċessi kinetiċi). Kull grupp ta' test ikollu fih mill-anqas 10 rodituri (5 rġiel u 5 nisa) li jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar għal 6 sigħat kuljum fuq bażi ta' 5 ijiem fil-ġimgħa għal perjodu ta' 4 ġimgħat (l-istudju jdum b'kollox 28 jum). L-annimali jistgħu wkoll ikunu esposti 7 ijiem fil-ġimgħa (eż. meta l-ittestjar ikun ħa farmaċewtiċi man-nifs). Jekk ikun magħruf li wieħed miż-żewġ sessi jkun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar, is-sessi jkunu jistgħu jiġu esposti f'livelli differenti ta' konċentrazzjoni biex isir l-aħjar użu mill-konċentrazzjoni-rispons kif deskritt fil-paragrafu 15. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta l-espożizzjoni ddum anqas minn 6 sigħat/jum, jew meta jkun meħtieġ li jsir studju ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu li jdum aktar (eż. 22 siegħa/jum) [irreferi għal GD 39 (2)]. M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzzjoni sakemm espożizzjoni ma ddumx aktar minn 6 sigħat. Jista' jingħata ilma matul l-espożizzjoni kollha tal-ġisem kollu.

15. Il-konċentrazzjonijiet immirati magħżulin għandhom jidentifikaw l-organu/i mmirat(i) u juru konċentrazzjoni-rispons ċari:

— Il-livell għoli ta' konċentrazzjoni għandu jirriżulta f'effetti tossiċi iżda m'għandux jikkawża sinjali jew letalità li jdumu u li ma jħallux li ssir evalwazzjoni li tagħmel sens.

— Il-livell(i) intermedju/i ta' konċentrazzjoni għandhom ikunu spazjati biex jipproduċu gradazzjoni ta' effetti tossiċi bejn dawk tal-konċentrazzjoni baxxa u dawk tal-konċentrazzjoni għolja.

— Il-livell baxx ta' konċentrazzjoni għandu jipproduċi ftit jew ebda evidenza ta' tossiċità.

Studju satellitarju (Riversibbiltà)

16. Studju satellitarju (riversibbiltà) jista' jintuża biex ikunu osservati r-riversibbiltà, il-persistenza jew l-okkorrenza mdewma ta' tossiċità għal perjodu ta' wara t-trattament ta' tul xieraq, iżda ta' mhux anqas minn 14-il jum. Gruppi satellitarji (riversibbli) jikkonsistu f'ħames irġiel u ħames nisa esposti kontemporanjament mal-annimali tal-esperimenti fl-istudju ewlieni. Gruppi ta' studju satellitarju (riversibbli) għandhom ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar fl-ogħla livell ta' konċentrazzjoni u għandu jkun hemm arja konkurrenti u/jew kontrolli ta' vejjikoli skont il-ħtieġa (ara l-paragrafu 17).

▼M4

Annimali tal-Kontroll

17. L-annimali tal-kontroll negattiv (arja) konkurrenti għandhom ikunu mmaniġġati b'mod identiku għall-grupp ta' annimali tat-test ħlief li huma jkunu esposti għal arja filtrata milli għal kimika għall-ittestjar. Meta l-ilma jew sustanza oħra jintużaw biex jassistu il-ġenerazzjoni tal-atmosfera tat-test, fl-istudju għandu jkun inkluż grupp ta' kontroll ta' vejjikoli, minflok grupp ta' kontroll negattiv (arja). Kull meta jkun possibbli għandu jintuża l-ilma bħala l-vejjikolu. Meta l-ilma jintuża bħala l-vejjikolu, l-annimali ta' kontroll għandhom ikunu esposti għall-arja bl-istess umdità relattiva bħal tal-gruppi esposti. L-għażla ta' vejjikolu adattat għandha tkun ibbażata fuq studju minn qabel immexxi sewwa jew fuq dejta storika. Jekk it-tossiċità ta' vejjikolu ma' tkunx magħrufa sewwa, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża kemm kontroll negattiv (arja), kif ukoll kontroll ta' vejjikolu, iżda dan għandu jkun skuraġġit bil-qawwa. Jekk dejta storika turi li vejjikolu ma jkunx tossiku, f'dak il-każ ma jkunx hemm ħtieġa għal grupp ta' kontroll negattiv (arja) u għandu jintuża biss kontroll ta' vejjikolu. Jekk studju minn qabel ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma turi ebda tossiċità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata u għandu jintuża dan il-kontroll ta' vejjikolu.

KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Amministrazzjoni ta' Konċentrazzjonijiet

18. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew taħlita tagħhom. L-istat fiżiku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fiżika li x'aktarx tkun preżenti matul l-immaniġġar u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet esplussivi. Il-materjal tal-partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli. Hija pprovduta gwida ulterjuri f'GD 39 (2).

Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Partiċelli

19. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex titħalla jkun hemm espożizzjoni tar-reġjuni kollha rilevanti tas-sistema respiratorja, huma rrakkomandati aerosols b'dijametri aerodinamiċi ta' medjan ta' massa (MMAD) f'firxa minn 1 sa 3 μm b'devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g) fil-firxa ta' 1,5 sa 3,0 (4). Għalkemm għandu jsir sforz raġonevoli biex dan l-istandard jintlaħaq, għandu jkun ipprovdut ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, il-partiċelli tad-dħaħen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u l-partiċelli u fibri ċċarġjati jistgħu jaqbżuh.

Preparazzjoni tal-Kimika għall-Ittestjar f'Vejjikolu

20. Idealment, il-kimika għall-ittestjar għandha tiġi ttestjata mingħajr vejjikolu. Jekk ikun meħtieġ jintuża vejjikolu biex ikunu ġġenerati l-konċentrazzjoni adattata tal-kimika għall-ittestjar u d-daqs tal-partiċelli, l-ilma għandu jingħata preferenza. Kull darba li kimika għall-ittestjar tinħall f'vejjikolu, l-istabbiltà tagħha għandha tintwera.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJIET TAL-ESPOŻIZZJONI

Fluss tal-Arja fil-Kamra

21. Il-fluss tal-arja fil-kamra tal-espożizzjoni għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u rreġistrat mill-anqas kull siegħa matul kull espożizzjoni. Il-monitoraġġ fil-ħin reali tat-konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà temporali) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdi mezzi indiretti għall-kontroll tal-parametri rilevanti u d-dinamiċi kollha tal-inalazzjoni. Jekk il-konċentrazzjoni tkun immonitorjata fil-ħin reali, il-frekwenza tal-kejl tal-flussi tal-arja tista' titnaqqas sa kejl wieħed għal kull espożizzjoni għal kull jum. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex tkun evitata l-inalazzjoni mill-ġdid fil-kmamar għall-imnieħer biss. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta'

▼M4

19 % u l-konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wieħed jemmen li dan l-istandard ma jkunx jista' jitlaħaq, il-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu u tad-dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu. Jekk il-kejlijiet fl-ewwel jum ta' espożizzjoni juru li dawn il-gassijiet ikunu ta' livelli tajbin, ma jkunux meħtieġa aktar kejlijiet.

Temperatura tal-Kamra u Umdità Relattiva

22. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm f'22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieħer biss, kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata kontinwament u rreġistrata kull siegħa matul kull espożizzjoni meta jkun possibbli. L-umdità relattiva għandha preferibbilment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati taħlitiet abbażi ta' ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minħabba interferenza mill-kimika għall-ittestjar mal-Metodu ta' Ttestjar.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni Nominali

23. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominali tal-kamra ta' espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda hija paragun tal-konċentrazzjoni nominali u l-konċentrazzjoni attwali tagħti indikazzjoni tal-effiċjenza ta' ġenerazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, tista' tintuża biex jinkixfu l-problemi ta' ġenerazzjoni.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni Attwali

24. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar kif ikun itteħdilha l-kampjun tagħha fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu b'metodi speċifiċi (eż. teħid dirett ta' kampjuni, metodi ta' assorbiment jew kimiċi reattivi, u karatterizzazzjoni analitika sussegwenti) jew b'metodi mhux speċifiċi bħal analiżi gravimetrika b'filtru. L-użu ta' analiżi gravimetrika huwa aċċettabbli biss għal aerosols tat-trab b'komponent wieħed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilità baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għall-kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'ħafna komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analiżi gravimetrika. Iżda din teħtieġ dejta analitika li turi li l-kompożizzjoni tal-materjal tal-ajru tkun simili għall-materjal tal-bidu. Jekk din l-informazzjoni ma tkunx disponibbli, tista' tkun meħtieġa analiżi mill-ġdid tal-kimika għall-ittestjar (idealment fl-istat tagħha fl-arja) f'intervalli regolari waqt li jkun għaddej l-istudju. Għal aġenti aerosolizzati li jistgħu jevaporaw jew jissubblimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu nġabru bil-metodu magħżul.

25. Għandu jintuża lott wieħed tal-kimika għall-ittestjar sakemm idum l-istudju, jekk ikun possibbli, u l-kampjun tat-test għandu jinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-purezza, l-omoġeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbeda l-istudju, għandu jkun hemm karatterizzazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkluża l-purezza tagħha, u jekk teknikament fattibbli, l-identità u l-kwantitajiet ta' kontaminanti u impuritajiet identifikati. Dan jista' jintwera iżda ma jkunx limitat mid-dejta li ġejja: ħin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimi oħra. Għalkemm l-identità tal-kampjun tat-test mhix ir-responsabbiltà tal-laboratorju tat-test, jista' jkun prudenti għal-laboratorju tat-test li jikkonferma l-karatterizzazzjoni tal-isponser għall-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

▼M4

26. L-atmosfera ta' espożizzjoni għandha tinżamm kostanti daqa kemm ikun prattikabbli. Jista' jintuża apparat ta' monitoraġġ f'ħin reali, bħalma huwa fotomiter tal-aerosol għal aerosols jew analizzatur tal-idrokarbur totali għall-fwar biex tintwera l-istabbiltà tal-kundizzjonijiet ta' espożizzjoni. Il-konċentrazzjonijiet attwali tal-kamra għandhom jitkejlu mill-anqas 3 darbiet matul kull jum ta' espożizzjoni għal kull livell ta' konċentrazzjoni. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minħabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew minħabba konċentrazzjonijiet baxxi, ikun aċċettabbli kampjun wieħed għal kull perjodu ta' espożizzzjoni. Idealment, dan il-kampjun għandu mbagħad jinġabar tul il-perjodu kollu ta' espożizzzjoni. Il-kampjuni individwali tal-konċentrazzjoni tal-kamra jistgħu jkollhom devjazzjoni mill-konċentrazzjoni medja tal-kamra b'mhux aktar minn ± 10 % għall-gassijiet u l-fwar, u b'mhux aktar minn ± 20 % għall-aerosols likwidi jew solidi. Il-ħin biex tinkiseb ekwilibrazzjoni tal-kamra (t_{95}) għandu jkun ikkalkulat u rrappurtat. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-ħin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata. Din tqis il-ħinijiet meħtieġa biex jinkisbu l-ekwilibrazzjoni (t_{95}) u d-degradazzjoni tal-kamra. Il-gGwida għal stima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (2).

27. Għal taħlitiet kumplessi ħafna li jikkonsistu f'gassijiet/fwar u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodotti/mezzi ta' użu finali b'għan speċifiku), kull faži tista' taġixxi b'mod differenti f'kamra tal-inalazzjoni. Għalhekk, għandha tintgħażel mill-anqas sustanza indikatriċi waħda (analita), normalment is-sustanza attiva prinċipali fit-taħlita, ta' kull faži (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun taħlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-taħlita totali, u mhux biss għall-ingredjent attiv jew għas-sustanza indikatriċi (analita). L-informazzjoni addizzjonali dwar konċentrazzjonijiet attwali tinsab f'GD 39 (2).

Kimika għall-Ittestjar: Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Partiċelli

28. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas kull ġimgħa għal kull livell ta' konċentrazzjoni billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv, bħall-għodda ajrudinamika li tagħti d-daqs lill-partiċelli (APS). Jekk tkun tista' tinkiseb ekwivalenza tar-riżultati miksubin minn impattur kaskata u mill-istrument alternattiv, f'dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista' jintuża tul l-istudju kollu.

29. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża b'mod parallell mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-ġabra. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi tad-daqs tal-partiċelli għandha tkun fil-limiti raġonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi b'filtru [ara GD 39 (2)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-konċentrazzjonijiet kollha ttestjati fil-faži bikrija tal-istudju, f'dak il-każ kejlijiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jitħallew barra. Biex jinżamm trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista' twassal għal ħtieġa ta' ripetizzjoni tal-istudju.

30. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista' tirriżulta kondensazzjoni ta' fwar fil-formazzjoni ta' aerosol, jew jekk jinstabu partiċelli f'atmosfera ta' fwar b'potenzjal għall-faživijiet imħallta.

OSSERVAZZJONIJIET

31. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament qabel, matul u wara l-perjodu ta' espożizzzjoni. Jistgħu jkunu indikati osservazzjonijet aktar ta' spiss skont ir-rispons tal-annimali matul l-espożizzjoni. Meta l-osservazzjoni tal-annimali tkun imfixkla bl-użu ta' tubi ta' trażżin tal-annimali, bi kmamar għall-ġisem kollu mixgħulin ħażin, jew b'atmosferi opaki, l-annimali għandhom ikunu osservati bir-reqqa wara l-espożizzjoni. L-osservazzjonijiet qabel l-espożizzjoni tal-jum li jkun imiss jistgħu jivvalutaw kwalunkwe riversibbiltà jew effetti tossiċi li jkunu marru aktar għall-agħar.

▼M4

32. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'reġistri individwali miżmumin għal kull annimal. Meta l-annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.

33. L-osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn, u l-membrani mukuża; il-bidliet fis-sistema respiratorja u ċirkulatorja, il-bidliet fis-sistema nervuża, u l-bidliet fl-attività somato-motorja u fix-xejriet tal-imġiba. Attenzjoni għandha tkun diretta għall-osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulżjonijiet, tbeżliq, dijarea, letarġija, rqad u koma. Il-kejl tat-temparaturi tar-rektum jista' jipprovdi evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ipo/ipertermja relatati mat-trattament jew l-għeluq. Jistgħu jkunu inklużi valutazzjonijiet addizzjonali fil-protokoll ta' studju bħal kinetika, monitoraġġ bijoloġiku, funzjoni tal-pulmun, ritenzjoni ta' materjali li ftit jinħallu li jinġemgħu fit-tessut tal-pulmun, u bidliet fl-imġiba.

PIŻIJIET TAL-ĠISEM

34. Il-piżijiet tal-annimali indivdwali għandhom jiġu rreġistrati ftit qabel l-ewwel espożizzjoni (jum)), u darbtejn fil-ġimgħa wara din (pereżempju: nhar ta' Ġimgħa u nhar ta' Tnejn biex juru l-irkupru matul tmiem il-ġimgħa mingħajr espożizzjoni jew matul intervall tal-ħin biex jippermetti valuazzjoni tat-tossiċità sistematika) jew fil-mument tal-mewt jew l-ewtanażja. Jekk ma jkunx hemm effetti fl-ewwel ġimagħtejn (2), il-piżijiet tal-ġisem jistgħu jitkejlu kull ġimgħa għall-bqija tal-istudju. L-annimali satellitarji (riversibbli) (jekk użati) għandhom jibqgħu jintiżnu kull ġimgħa tul il-perjodu kollu ta' rkupru. Fi tmiem l-istudju, l-annimali kollha għandhom jintiżnu ftit qabel il-qatla biex titħalla ssir kalkulazzjoni imparzjali tal-proporzjonijiet tal-organi mal-piżijiet tal-ġisem.

KONSUM TAL-IKEL U L-ILMA

35. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel kull ġimgħa. Il-konsum tal-ilma wkoll jista' jitkejjel.

PATOLOĠIJA KLINIKA

36. Il-valutazzjonijiet tal-patoloġija klinika għandhom isiru għall-annimali kollha, inklużi annimali ta' kontroll u satellitarji (riversibbli), meta jinqatlu. L-intervall ta' ħin bejn tmiem l-espożizzjoni u l-ġbir tad-demm għandu jiġi rreġistrat, l-aktar meta l-kostituzzjoni mill-ġdid tal-punt ta' tmiem indirizzat tkun mgħaġġla. It-teħid ta' kampjuni wara tmiem espożizzjoni huwa indikat għal dawk il-parametri b'nofs ħajja plażmatika qasira (eż. COHb, CHE, and MetHb).

37. It-Tabella 1 telenka l-parametri ta' patoloġija klinika li ġeneralment ikunu meħtieġa għall-istudji tossikoloġiċi kollha. L-analiżi tal-awrina ma tkunx meħtieġa abbażi ta' rutina, iżda tista' ssir meta titqies utli bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jivvaluta parametri addizzjonali biex jikkaratterizza aħjar it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar (eż. kolinesteraži, lipidi, ormoni, bilanċ ta' aċidu/baži, metemoglobina jew korpi ta' Heinz, kinaži tal-kreatina, proporzjon ta' mjelojde/eritrojde, troponini, gassijiet ta' demm arterjali, deidroġenaži lattat, deidroġenaži tas-sorbitol, glutamat ta' deidroġenaži u gamma glutamil transpeptidaži).

▼M4

Tabella 1

Parametri Standard ta' Patoloġija Klinika

Ematoloġija	
Għadd ta' eritroċiti	Għadd totali ta' lewkoċiti
Ematokrit	Għadd differenzjali ta' lewkoċiti
Konċentrazzjoni ta' emoglobina	Għadd ta' pjastrini
Emoglobina korpuskulari medja	Potenzjal għal emboliżmu (agħżel wieħed):
Volum korpuskulari medju	— Ħin protrombin
Konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja	— Ħin ta' emboliżmu
Retikuloċiti	— Ħin tromboplastin parzjali

Kimika klinika	
Glukożju (*)	Aminotransferaži tal-alanina
Kolesterol totali	Aspartate aminotransferaži
Trigliċeridi	Fosfataži alkalina
Nitroġenu tal-urea tad-demm	Potassju
Bilirubina totali	Sodju
Kreatinina	Kalċju
Proteina totali	Fosforu
Albumina	Klorur
Globulina	

Analiżi tal-awrina (fakultattiva)	
Dehra (lewn u turbidità)	Proteina totali
Volum	Glukożju
Gravità speċifika jew ożmolalità	Demm/ċelluli tad-demm
pH	

(*) Minħabba li perjodu ta' sawm fit-tul jista' jintroduċi parzjalità fil-kejl tal-glukożju għall-annimali ttrattati ma' dawk tal-kontroll, id-direttur tal-istudju għandu jiddetermina jekk ikunx sewwa li jsajjem lill-annimali. Jekk jintuża perjodu ta' sawm, dan għandu jkun adattat għall-ispeċi użata; għall-far dan jista' jkun 16-il siegħa (sawm tul il-lejl). Determinazzjoni ta' glukożju għas-sawm tista' ssir wara sawm tul il-lejl matul l-aħħar ġimgħa ta' espożizzjoni, jew wara sawm tul il-lejl qabel awtopsja (f'dan l-aħħar każ flimkien mal-parametri patoloġiċi kliniċi l-oħra kollha).

38. Meta jkun hemm evidenza li s-sistema respiratorja inferjuri (jiġifieri, l-alveoli) tkun is-sit primarju ta' depożizzjoni u ritenzjoni, f'dak il-każ il-ħasil tal-bronkoalveolari (BAL) jista' jkun it-teknika ta' għażla biex ikunu analizzati kwantitattivament parametri b'effett ta' doża abbaži ta' ipoteži li jiffokaw fuq l-alveolitis, l-infjammazzjoni pulmonari, u l-fosfolipidoži. Dan jippermetti li jkunu investigati sewwa bidliet ta' doża-rispons u ta' perkors ta' żmien meta jkun hemm ħsara alveolari. Il-fluwidu BAL jista' jkun analizzat għal għedud totali u differenzjali ta' lewkoċiti, proteina totali u deidroġenaži lattat. Parametri oħra li jistgħu jitqiesu huma dawk li jindikaw ħsara liżosomali, fosfolipidoži, fibroži u infjammazzjoni irritanti jew allerġika li tista' tinkludi d-determinazzjoni ta' ċitokines/kejmokines proinfjammatorji. Il-kejlijiet BAL ġeneralment jikkumplimentaw ir-riżultati minn eżamijiet ta' istopatoloġija iżda ma jistgħux jeħdulhom posthom. Gwida dwar kif isir il-ħasil tal-pulmuni tinsab f'GD 39 (2).

▼M4

PATOLOĠIJA MAKROSKOPIKA U PIŻIJIET TAL-ORGANI

39. L-annimali kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jitneħħew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal żvinar sħiħ (jekk ikun jista' jsir) u għal awtopsja makroskopika. Il-ħin bejn it-tmiem tal-aħħar espożizzjoni ta' kull annimal u meta jinqatel għandu jiġi rreġistrat. Jekk ma tkunx tista' ssir awtopsja minnufih wara li jkun instab annimal mejjet, l-annimal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperatura baxxa biżżejjed biex tkun imminimizzata awtoliżi. Awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopiċi kollha għandhom jiġi rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.

40. It-Tabella 2 telenka l-organi u t-tessuti li għandhom ikunu ppreservati f'midjum adattat matul awtopsja makroskopika għal eżami istopatoloġiku. Il-preservazzjoni tal-organi u tat-tessuti [mqegħdin flimkien] u ta' kull organu u tessut ieħor tkun fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. L-organi mitkubin b'**tipa grassa** għandhom jintraqmu u jintiżnu mxarbin malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni biex ikun evitat it-tnixxif. It-tirojde u l-epididimi għandhom jintiżnu biss jekk ikun meħtieġ minħabba li ċ-ċelloli mill-irqim jistgħu jfixklu l-evalwazzjoni istopatoloġika. It-tessuti u l-organi għandhom jitqiegħdu f'10 % ta' formalina newtralizzata jew f'fissattiv adattat ieħor malli ssir l-awtopsja, u mhux f'anqas minn 24-48 siegħa qabel l-irqim skont il-fissattiv li għandu jintuża.

Tabella 2

Organi u Tessuti Ippreservati Matul Awtopsja Makroskopika

Adrenali	Bżieżaq seminali
Mudullun tal-għadam (u/jew aspirat frisk)	Nerv vertebrali (ċervikali, midtoraċiku u lumbari)
Moħħ (inklużi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/mežoċefalu)	**Milsa**
[Għajnejn (retina, nerv ottiku) u tebqiet l-għajnejn]	Stonku
Qalb	**Testikoli**
Kliewi	**Timu**
Larinġi (3 livelli, 1 livell biex jinkludi l-baži tal-epiglotta)	Tirojde
Fwied	Trakea (mill-anqas 2 livelli inkluża 1 taqsima longitudinali tul il-karina u 1 taqsima trasversali)
Pulmun (id-denduliet kollha f'livell wieħed, inklużi l-bronki ewlenin)	[Bużżieqa tal-awrina]
Nodi limfatiċi mir-reġjun ilarju tal-pulmun, speċjalment għal kimiċi f'partiċelli għall-ittestjar li ftit jinħallu. Għal eżamijiet u/jew studji aktar fil-fond b'fokus immunoloġiku, jistgħu jitqiesu nodi limfatiċi addizzjonali, eż. dawk mir-reġjuni medjastinali, ċervikali/submandibulari u/jew awrikulari.	Utru
	Il-leżjonijiet kbar kollha
It-tessuti nażofarinġali (mill-anqas 4 livelli; 1 livell biex jinkludi l-kanal nażofarinġali u t-Tessut Limfojde b'Assoċjazzjoni Nażali (NALT)	
Esofagu	
[Basla tax-xamm]	
Ovarji	

▼M4

41. Il-pulmuni għandhom jitneħħew intatti, jintiżnu u jiddaħħlu b'fissattivi adatti bi pressjoni ta' 20-30 cm ta' ilma biex ikun żgurat li tinżamm l-istruttura tagħhom (5). Għandhom jinġabru taqsimiet għad-denduliet kollha f'livell wieħed, inklużi l-bronki ewlenin, iżda jekk isir il-ħasil tal-pulmuni, id-dendula mhux maħsula għandha titqiegħed fit-taqsima bi tliet livelli (mhux taqsimiet tas-serje).

42. Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas 4 livelli tat-tessuti nażofariġali, li wieħed minnhom għandu jinkludi l-kanal nażofariġali, (5, 6, 7, 8, 9) biex jitħalla jsir eżami adegwat tal-epitelju mimli qxur, tranżizzjonali (respiratorju mhux vibrali), respiratorju (respiratorju vibrali) u tax-xamm, u tat-tessut limfatiku tat-tisfija (NALT; 10, 11). Għandhom ikunu eżaminati tliet livelli tal-lariġi, u wieħed minn dawn il-livelli għandu jinkludi l-bażi tal-epiglotta (12). Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas żewġ livelli tat-trakea, inkluża taqsima waħda longitudinali tul il-karina minn fejn il-bronki estrapulmonari jinqasmu fi tnejn u taqsima waħda trasversali.

ISTOPATOLOĠIJA

43. Evalwazzjoni istopatoloġika tal-organi u tat-tessuti kollha elenkati fit-Tabella 2 għandha ssir għall-gruppi ta' kontroll u ta' konċentrazzjoni għolja, u għall-annimali kollha li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lis-sistema respiratorja, organi mmirati u leżjonijiet kbar. L-organi u t-tessuti li jkollhom leżjonijiet fil-grupp ta' konċentrazzjoni għolja għandhom ikunu eżaminati fil-gruppi kollha. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jagħmel evalwazzjonijiet istopatoliġiċi għal gruppi addizzjonali biex juri rispons ċar ta' konċentrazzjoni. Meta jintuża grupp satellitarju (riversibbli), għandha ssir evalwazzjoni istopatoloġika għat-tessuti u l-organi kollha identifikati bħala li jkunu juru effetti fil-gruppi ttrattati. Jekk ikun hemm għadd eċċessiv ta' mwiet bikrija jew problemi oħra fil-grupp ta' espożizzjoni għolja li jippreġudikaw is-sinifikat tad-dejta, il-konċentrazzjoni aktar baxxa li jkun imiss għandha tkun eżaminata istopatoloġikament. Għandu jsir sforz biex osservazzjonijiet gravi jitqabblu ma' sejbiet mikroskopiċi.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

44. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwali dwar il-piżijiet tal-ġisem, il-konsum ta' ikel, il-patoloġija klinika, il-patoloġija makroskopika, il-piżijiet ta' organi u l-istopatoloġija. Dejta dwar osservazzjonijiet kliniċi għandha tingħabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali użati, l-għadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali speċifiċi ta' tossiċità, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-ħin tal-mewt ta' kull annimal, deskrizzjoni u perkors ta' żmien ta' effetti tossiċi u riversibbiltà, u sejbiet minn awtopsji. Ir-riżultati kollha, kwantitattivi u inċidentali, għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika adattat. Jista' jintuża kull metodu ta' statistika ġeneralment aċċettat u l-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju.

Rapport tat-Test

45. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, kif jixraq:

Annimali tat-test u trobbija

— Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta.

▼M4

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far; Jistgħu jkunu pprovduti sors u dejta storika, jekk ikunu minn annimali esposti f'kundizzjonijiet simili ta' espożizzjoni, abitazzjoni u sawm.

— Għadd, età u sess tal-annimali.

— Metodu ta' każwalità.

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard.

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza, u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża isomerizzazzjoni).

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS), jekk ikunu magħrufa;

Vejjikolu

— Ġustifikazzjoni għal użu ta' vejjikolu u ġustifikazzjoni għal għażla tal-vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

— Dejta storika jew konkurrenti li turi li l-vejjikolu ma jfixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni dettaljata tal-kamra tal-inalazzjoni inkluż volum u dijagramma.

— Sors u deskrizzjoni ta' tagħmir użat għall-espożizzjoni tal-annimali, kif ukoll ġenerazzjoni tal-atmosfera.

— Tagħmir għall-kejl tat-temperatura, umdità, daqs ta' partiċelli u konċentrazzjoni attwali;

— Sors ta' arja u sistema użata għal kondizzjonament.

— Metodi użati għall-kalibrazzjoni ta' tagħmir biex tkun żgurata atmosfera omoġenea tat-test.

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva).

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieħer biss); tqegħid tal-annimali fil-kamra (ġisem kollu).

— Stabbiltà tal-atmosfera tat-test.

— Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u teħid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;

— Trattament ta' arja pprovduta/estratta.

— Rati ta' fluss tal-arja, rata ta' fluss ta' arja/port ta' espożizzjoni (mnieħer biss), jew toqol tal-annimali/kamra (ġisem kollu).

— Ħin għall-ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t95).

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli).

Dejta ta' espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni.

▼M4

— Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal ġol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra).

— Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-żona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal taħlitiet li jipproduċu forom fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament.

— Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (mg/l mg/m^3, eċċ.) milli f'unitajiet ta' volum (ppm, ppb, eċċ.).

— Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli, dijametru ajrudinamiku ta' medjan tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Għandha tkun irrappurtata analiżi individwali ta' kull daqs ta' partiċella.

Kundizzjonijiet tat-test

— Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kull proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli ta' solidi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar.

— Deskrizzjoni (preferibbilment inkluża dijagramma) tat-tagħmir użat biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test u biex l-annimali jkunu esposti għall-atmosfera tat-test.

— Dettalji tat-tagħmir użat biex jimmonitorja t-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss ta' arja fil-kamra (jiġifieri żvilupp ta' kurva ta' kalibrazzjoni).

— Dettalji tat-tagħmir użat biex jinġabru kampjuni għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-kamra u d-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli.

— Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u tal-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-teħid tal-kampjuni);

— Metodu ta' każwalità fl-assenjazzjoni ta' annimali lil gruppi ta' ttestjar u ta' kontroll.

— Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inklużi tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma).

— Il-motiv għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test.

Riżultati

— Tabulazzjoni tat-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss tal-arja.

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' konċentrazzjoni nominali u attwali tal-kamra.

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar id-daqs tal-partiċelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli u kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g.

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar rispons u ta' livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri, annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, iż-żmien meta jfaqqgħu u durata tal-effetti).

▼M4

— Tabulazzjoni tal-piżijiet individwali ta' kull annimal.

— Tabulazzjoni tal-konsum tal-ikel

— Tabulazzjoni ta' dejta ta' patoloġija klinika

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli.

— Tabulazzjoni ta' kull parametru ieħor imkejjel

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfażi partikolari għad-deskrizzjoni tal-metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-konċentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-partiċelli.

— Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni fil-partiċelli, meqjusin is-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-partiċelli ma setgħux jitħarsu;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probbbali tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati.

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm ħtieġa li b'mod uman jinqatlu annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).

— L-organu/i mmirat(i) għandu/hom jiġi/u identifikat/i.

— NOAEL u LOAEL għandhom ikunu ddeterminati.

LETTERATURA:

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP u Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-Ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼B

B.9. **DOŻI REPETUTI (28 JUM) TOSSIĊITÀ (DERMALI)**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (A).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (B).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. PRINCIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test hija somministrata b'mod orali, ta' kuljum, b'doži meqjusa lil diversi gruppi ta' annimali sperimentali, b'doża waħda tkun użata ma kull grupp matul perjodu ta' 28 jum. Matul il-perjodu ta' l-amministrazzjoni, l-annimali huma osservati ta' kuljum sabiex ikunu skoperti sinjali tat-tossiċità. Annimali li jmutu matul it-test ikollhom awtopsija tal-mewt u l-konklużjoni tat-test li l-annimali li jibqgħu ħajjin ikollhom ukoll l-awtopsija ta' wara l-mewt.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Preparazzjonijiet**

L-annimali huma miżmuma f'fondi sperimentali u f'kundizzjonijiet tal-għalf għal mill-anqas ħamest ijiem. Qabel it-test, annimali adulti żgħażagħ b'saħħithom huma magħżula b'mod kif jinzerta u assenjati lejn gruppi għat-trattament. Xi ftit qabel it-testijiet, il-pil huwa maqtugħ miż-żona dorsali tad-dahar ta' l-annimali tat-test. It-tqaxxir jista' jkun użat imma għandu jkun imwettaq madwar 24 siegħa qabel it-test. Ir-repetizzjoni tal-qtugħ jew tat-tqaxxir normalment ikun meħtieġ f'intervalli ta' madwar darba fil-ġimgħa. Meta jsir il-qtugħ jew it-tqaxxir tal-pil, kura għandha tittieħed sabiex ikun evitat xi grif fil-ġilda li jkunu jistgħu jibdlu l-permeabbiltà tagħha. Mhux anqas minn 10 % tal-wiċċ tal-ġisem għandu jkun imnaddaf għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-piż ta' l-annimali għandu jkun meqjus meta tkun deċiża ż-żona li għandha tkun imnaddfa u l-qisien kollha tal-koperta. Meta jsiru testijiet tas-solidi, li jistgħu ikunu pulverizzati jekk xieraq, is-sustanza tat-test għandha tkun b'umidità suffiċjenti bl-ilma, jew, meta meħtieġ, apparat adattat sabiex jassigura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Sustanzi likwidi tat-test huma ġeneralment użati mingħajr ma jkunu mrattba. Applikazzjoni odjerna bħala bażi ta' minn ħamsa sa sebat ijiem fil-ġimgħa hija użata.

1.6.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.6.2.1. *Annimali sperimentali*

Firien jew fniek, jew fniek ta' l-indi adulti jistgħu ikunu użati. Speċje oħrajn jistgħu ikunu użati imma l-użu tagħhom ikun jeħtieġ ġustifikazzjoni.

▼B

Fil-bidu ta' kull test, il-medda tal-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi ± 20 % tal-valur medju kif xieraq.

1.6.2.2. *Numru u sess.*

Mill-anqas 10 annimali gerriema (ħamsa femminili u ħamsa maskili) għandhom ikunu użati f'kull livell ta' doża. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma weldu u li ma humiex tqal. Jekk sagrifikar interim huwa ippjanat, in-numru ta' l-annimali għandu jkun miżjud bin-numru ta' l-annimali skedati li jkunu sagrifikati qabel it-tkomplija ta' l-istudju. B'żieda, grupp satellita ta' 10 annimali (ħames annimali kull sess) jistgħu ikunu ittrattati b'doża ta' livell għoli għal 28 jum u osservati għar-riversabbiltà, persistenza, jew għal okkurrenza mdewma ta' l-effetti tossiċi għal 14-il jum ta' wara t-trattament. Grupp satellita ta' 10 annimali ta' kontroll (ħames annimali kull sess) huwa wkoll użat.

1.6.2.3. *Livell tad-doża*

Mill-anqas tlett livelli ta' dożi huma meħtieġa bil-kontroll u mezz ta' kontroll, jekk mezz ikun użat. Il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkun ta' mill-anqas ta' sitt siegħat kuljum. Għal sustanzi amministrati bi tmiegħ sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija f'ħinijiet simili f'kull jum u l-livelli tad-doża għandhom ikunu aġġustati matul l-intervalli (ta' kull ġimgħa jew ta' darbtejn fil-gimgħa) sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż ta' l-annimal. Apparti milli t-trattament tas-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ikunu trattati b'mod identiku bħal dawk suġġetti għat-test. Meta mezz ikun użat sabiex jiffaċilita l-għoti tad-doża, l-kontrolli għandhom ikollhom doża bil-mezz bl-istess mod bħal gruppi ittrattati, u jirċievu l-istess ammont ta' mezz bħal dak li jkunu irċevew il-grupp bil-livell ta' l-ogħla doża. Il-livell ta' l-ogħla doża għandu jirriżulta f'effetti tossiċi imma ma jipproduċi l-ebda, jew ftit, imwiet. Il-livell tad-doża l-aktar baxxa m'għandux jipproduċi xi evidenza ta' tossiċità. Meta jkun hemm estimi użabbli ta' l-espożizzjoni umana, il-livell l-aktar baxx għandu jeċċedi dan. Idealment, il-livell medju tad-doża għandu jipproduċi effetti tossiċi minimi osservabbli. Jekk aktar minn doża intermedja waħda tkun użata, l-livelli tad-doża għandhom ikunu spazzjati bi gradjazzjoni ta' l-effetti tossiċi. Fil-gruppi baxxi jew intermedji u f'dawk tal-kontroll, l-inċidenza ta' xi fatalitajiet għandha tkun baxxa sabiex tippermetti ewalwazzjoni sensibbli tar-riżultati.

Jekk l-applikazzjoni tas-sustanzi tat-test tipproduċi irritazzjoni severa tal-ġilda, l-konċentrazzjonijiet għandhom ikunu mnaqqsa u dan jista' jirriżulta fi tnaqqis fil, jew fl-assenza ta', l-effetti tossiċi l-oħrajn, fil-livell għoli tad-doża. Aktar minn hekk, jekk il-ġilda tkon sofriet ħsara qawwija, jista' jkun meġtieġ li jkun imwaqqaf l-istudju u li jinbeda studju ġdid b'konċentrazzjoni aktar baxxa.

1.6.2.4. *Test ta' limitazzjoni*

Jekk studju preliminari fil-livell ta' doża ta' 1 000 mg/kg, jew livell ta' doża ogħla relattat ma l-espożizzjoni umana possibbli meta dan ikunu magħruf, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi, aktar testijiet ma jkunu aktar meqjusa bħala meħtieġa.

1.6.2.5. *Perijodu ta' l-Osservazzjoni*

L-annimali sperimentali għandhom ikunu osservati ta' kuljum għal sinjali tat-tossiċità. Il-ħin tal-mewt u ż-żmien li fih tidher jew tisparixxi t-tossiċità għandhom ukoll ikunu irreġistrati.

▼B

1.6.3. **Il-proċedura**

L-annimali għandhom jinżammu f'gaġġeġ individwali. L-annimali jirċievu d-doża bis-sustanza tat-test idealment fis-sebat ijiem tal-ġimgħa għal perjodu ta' 28 jum. L-annimali f'xi grupp satellita skedat għall-osservazzjoni b'segwiment għandhom jinżammu għal 14-il jum ieħor mingħajr trattament sabiex tkun żvelata xi irkupru minn, jew il-persistenza ta', l-effetti tossiċi. Il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkun ta' mill-anqas ta' sitt siegħat kuljum.

Is-sustanza tat-test għandha tkun applikata b'mod uniformi fuq żona li hija madwar 10 % taż-żona totali tal-wiċċ tal-ġisem. B'sustanzi ferm tossiċi, iż-żona tal-wiċċ koperta tista' tkun anqas imma kemm jista' jkun miż-żona għandha tkun koperta b'saff irqieq u uniformi kemm jista' jkun possibbli.

Matul l-espożizzjoni s-sustanza tat-test tinżamm f'kuntatt mal-ġilda b'garża poruża u faxxa mhux irritanti. Is-sit tat-test għandu jkun aktar kopert b'mod xieraq sabiex iżomm il-faxxex bil-garża u s-sustanza tat-test u jassiguraw li l-annimali ma jkunux jistgħu jilgħaqu u jieklu s-sustanza tat-test. Restrizzjonijiet jistgħu jintużaw sabiex jipprevjenu l-inġestjoni tas-sustanza tat-test, imma immobilizzazzjoni kompleta mhix metodu rakkommandat. Bħala alternattiva, "apparat b'għonq protettiv" jista' jkun użat.

Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, ir-residwu tas-sustanza tat-test għandu jkun imneħħi, meta prattikabbli, bl-użu ta' ilma jew xi metodu xieraq ieħor tat-tindif tal-ġilda.

L-annimali kollha għandhom ikunu osservati ta' kuljum u s-sinjali tossiċi irreġistrati jkunu inklużi, meta jsir it-tfaqqiegħ, il-grad u t-tul ta' żmien tagħhom. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-ġilda u l-pil, fl-għajnejn u membrani mukożji, u anki fis-sistemi respiratorji, ċirkolatorji, awtonomiċi u tas-sistema ċentrali tan-nervituri; l-attività somatomotori u l-istil ta' l-imġieba. Il-kejl għandu jsir ta' kull ġimgħa dwar il-piż ta' l-annimali. Huwa wkoll rakkommandat li l-konsum ta' l-ikel ikun imkejjel ta' kull ġimgħa. Osservazzjonijiet regolari ta' l-annimali huma meħtieġa sabiex jassiguraw li l-annimali jkunu, sakemm ikun possibbli, mhux mitlufa mill-istudju minħabba kawżi oħrajn bħalma huma kannibaliżmu, awtolożi tan-nisġa jew mitlufa. Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-istudju, dawk kollha li jkunu għadhom ħajjin fil-gruppi tat-trattament mhux-satellita, jkunu maqtula u awtopsija tkun imwettqa immedjatament. Annimali moribondi u annimali f'uġiegħ jew strapazz sever għandhom ikunu mneħħija meta dan ikun innutat, u maqtula sabiex tkun evitata l-moħqrija u titwettaq awtopsja ta' wara l-mewt.

L-eżami li ġejja għandha sseħħ fit-tmiem tal-perjodu tat-test għall-annimali kollha, inklużi dawk tal-kontrolli:

1) ħematoloġija, inkluża mill-anqas il-ħematokrità, l-konċentrazzjoni tal-ħemaglobulini, l-għadd ta' l-eritroċiti, l-għadd totali u differenzali tal-lewtoċiti, u l-kejl tal-potenzal ta' boċċi fid-demm;

2) biokemistrija klinika tad-demm, inkluż mill-anqas parametru wieħed tal-fwied u tal-funzjoni tal-kliewi: aminotransferaži ta' l-alanina tas-serum (qabel kienet magħrufa bħala t-transaminaži piruvika glutamika), il-aminotransferaži aspartata tas-serum (qabel kienet magħrufa bħala t-transaminaži ossalo-aċetika glutamika), in-nitroġenu ta' l-urea, l-albumina, il-kreatinin tad-demm, il-bilirubin totali u l-protein totali tas-serun.

Determinazzjonijiet oħrajn li jistgħu jkunu meħtieġa għal evalwazzjoni tossikologika adekwata, inkluż il-kalċju, l-fosfru, l-klorid, is-sodju, il-putassa, l-glokożju tas-sawm, l-analiżi tal-lipidi, l-ormoni, l-bilanċ tal-aċidu/bażi, l-metaemoglobina, l-attività kolinesteraži.

▼B

Biokemistrija klinika addizzjonali tista' tkun użata, meta meħtieġ, sabiex tkun estiża l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati.

1.6.4. **Nekopsija Grossa (awtopsija ta' wara l-mewt)**

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu suġġetti għall-awtopsja sħiħa grossa ta' wara l-mewt. Mill-anqas il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, u t-testi għandhom ikunu miżuna niedja malajr kemm jista' jkun poissibbli wara d-dissikazzjoni sabiex ikun evitat li jinxfu. Organi u ċerti nsiġ tal-ġisem (fwied, kliewi, il-milsa (l-marrara), it-testi, l-adrenali, l-qalb, u xi organi oħrajn li juru feriti kbar jew tibdil fid-daqs) għandhom ikunu ippreservati f'medja xierqa għall-possibbiltà ta' eżami futura ħistopatoloġika.

1.6.5. **Eżaminazzjoni ħistopatoloġika**

Fil-grupp ta' doża għolja u fil-grupp ta' kontroll, l-eżaminazzjoni ħistoloġika għandha tkun imwettqa fuq l-organi u l-insiġ ippreservati. Organi u nsiġ li juru difetti attribwibbli għas-sustanza tat-test fil-livell ta' l-ogħla doża għandhom ikunu eżaminati fil-gruppi kollha tad-doża l-baxxa. L-annimali f'xi grupp satellita għandhom ikunu eżaminati ħistoloġikalment b'enfasi partikolari fuq l-organi u nsiġ identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi l-oħrajn ittrattati.

2. **DATA**

Id-data għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test u n-numru ta' l-annimali li jiżvelaw kull tip ta' ferita.

Ir-riżultati osservati kollha għabdhom ikunu evalwati b'metodu statistiku xieraq. Kwalunkwe metodu statistikali rikonoxxut jista' jkun użat.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— id-dettalji dwar l-annimal (l-ispeċje, silta, sorsi, il-kundizzjonijiet ambjentali, dieta, eċċ.);

— kundizzjonijiet tat-test (inklużu t-tip ta' faxex: okklussivi jew mhux okklussivi);

— il-livelli tad-doża (inkluż il-mess, jekk użat), u l-konċentrazzjonijiet;

— il-livell ta' l-ebda effett, meta possibbli;

— dettalji dwar ir-reazzjoni tossika bis-sess u d-doża;

— il-ħin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqgħu ħajjin fit-terminazzjoni tat-test;

— l-effetti tossiċi jew oħrajn;

— il-ħin ta' l-osservazzjoni u kull sinjal annormali u l-korsa sussegwenti tiegħu;

— dettalji dwar l-ikel u piż tal-ġisem;

— testijiet ħematoloġiċi użati u r-riżultati kollha;

▼B

— testijiet ħematoloġiċi kliniċi użati u r-riżultati kollha;

— is-sejbiet ta' l-awtopsja ta' wara l-mewt;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet ħistopatoloġiċi kollha;

— trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq;

— diskussjoni tar-riżultati;

— interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (D).

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (E).

▼B

B.10. MUTAĠENIĊITÀ – TEST *IN VITRO* DWAR ANORMALITÀ FIL-KROMOŻOMITAL-MAMMIFERI

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 473, Test *in vitro* dwar Anormalità fil-Kromożomi tal-Mammiferi (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

L-għan tat-test *in vitro* dwar anormalità fil-kromożomi huwa biex jiġu identifikati aġenti li jikkawżaw anormalitajiet strutturali fil-kromożomi f'kulturi ta' Ċelloli tal-mammiferi (1) (2) (3). Anormalitajiet strutturali jistgħu jkunu ta' żewġ tipi, kromożomi jew kromatidi. Fil-maġġoranza ta' mutaġeni kimiċi, anormalitajiet imġiegħela huma tat-tip kromatidu, iżda jirrikorru wkoll anormalitajiet tat-tip ta' kromożomi. Żieda fil-poliplojdi tista' tindika li kimika għandha l-potenzal li ġġib magħha anormalitajiet numeriċi. Madankollu, dan il-metodu mhux maħsub biex iqis anormalitajiet numeriċi u ma jintużax normalment għal dak il-għan. Mutazzjonijiet fil-kromożomi u ġrajjiet relatati huma l-kawża ta' ħafna mard ġenetiku fil-bniedem u hemm xhieda sostanzjali li mutazzjonijiet fil-kromożomi u ġrajjiet relatati li jikkawżaw alterazzjonijiet f'onkoġeni u f'ġeni ta' Ċelloli somatiċi li jrażżnu t-tumuri huma involuti fil-ħolqien tal-kanċer fil-bniedem u annimali sperimentali.

It-test *in vitro* ta' anormalità fil-kromożomi jista' jagħmel użu minn kulturi ta' linji ta' Ċelloli stabbiliti, tipi ta' Ċelloli, jew kulturi ta' Ċelloli primarji. Iċ-ċelluli jingħażlu fuq bażi ta' kemm jistgħu jikbru fil-kultura, l-istabbilità tal-karjotip, għadd ta' kromożomi, diversità ta' kromożomi u frekwenza spontanea ta' anormalitajiet fil-kromożomi.

Testijiet magħmula *in vitro* ġeneralment jeħtieġu l-użu ta' għejun essoġenu ta' attivazzjoni metabolika. Din is-sistema ta' attivazzjoni metabolika ma tista'x kompletament tkun bħall-kundizzjonijiet *in vivo* tal-mammiferi. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati kundizzjonijiet li jwasslu għal riżultati pożittivi li ma jirriflettux mutaġeneċità intrinsika u jistgħu jinħolqu minn bidliet fil-pH, osmolalità jew livelli għoljin ta' ċitotossiċità (4) (5).

It-test jintuża biex jiġi kontrollat hemmx mutaġeni jew karċinoġeni fil-mammiferi. Ħafna komposti li huma pożittivi f'dan it-test huma karċinoġeni fil-mammiferi; madankollu ma hemmx korrelazzjoni perfetta bejn dan it-test u l-karċinoġeniċità. Il-korrelazzjoni tiddependi fuq il-klassi kimika u hemm xiedha dejjem tikber li jeżistu karċinoġeni li ma jiġux żvelati b'dan it-test għax jidher li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi li huma differenti minn ħsara diretta fid-DNA.

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali Taqsima B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Anormalità tat-tip kromatidu: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-ġdid bejn kromatidi.

Anormalità tat-tip tal-kromożomi: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-ġdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

▼B

Endoreduplikazzjoni: proċess li fih wara perjodu S ta' replikazzjoni ta' DNA, in-nukleu ma jispiċċax f'mitożi iżda jerġa' jibda perjodu ieħor S. Ir-riżultat hu kromożomi bi 4, 8, 16,… kromatidi.

Vojt: leżjoni akromatika iżgħar mill-wisgħa ta' kromatid wieħed, u b'misallinjament minimu tal-kromatidi.

Indiċi mitotiku: il-paragun ta' Ċelloli fil-metafaži diviżi min-numru totali ta' Ċelloli osservati f'popolazzjoni ta' Ċelloli; indikazzjoni tal-livell ta' profilerazzjoni ta' dik il-popolazzjoni.

Anormalità numerika: bidla fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristku normali ta' Ċelloli utilizzati.

Poliplojdi: multiplu tan-numru aplojdu ta' kromożomi (*n*) minbarra n-numru diplojdu (jiġifieri 3*n*, 4*n*, eċċetera).

Anormalità strutturali: bidla fl-istruttura tal-kromożomi li wieħed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku ta' l-istadju metafażiku tad-diviżjoni ta' ċelluli, osservati bħala tħassir u biċċiet, bidliet minn ġewwa u bidliet bejniethom.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Kulturi ta' Ċelloli huma esposti għas-sustanza tat-test kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha. F'intervalli predeterminati wara l-espożizzjoni ta' kulturi ta' Ċelloli għas-sustanza tat-test, jiġu ttrattati b'sustanza li twaqqaf il-metafaži (eż. Colcemid® jew kolċiċina), Ċelloli maħsudin, mtebbgħin u matafażiċi jiġu analizzati taħt mikroskopju għall-preżenza ta' anormalitajiet fil-kromożomi.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Ċelloli*

Jistgħu jintużaw varjetà ta' linji ta' Ċelloli, tipi ta' Ċelloli jew kulturi primarji ta' Ċelloli, inklużi Ċelloli umani (eż. fibroblasti ta' Chinese hamster, limfoċiti tad-demm umani jew periferali mal-mammiferi oħrajn).

1.4.1.2. *Il-kundizzjonijiet tal-medjum u tal-kulturi*

Għandhom jintużaw medjum xieraq ta' kulturi, u kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni (kontenituri għall-kulturi, konċentrazzjoni CO_2, temperatura u umdità) sabiex jinżammu l-kulturi. Linji u tipi ta' ċelluli stabbiliti għandhom jiġu kontrollati kull tant żmien għall-istabbilità fl-għadd ta' kromożomi modali u għan-nuqqas ta' kontaminazzjoni minn mikoplasma u m'għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati. Għandu jkun magħruf ukoll il-perjodu normali ta' ċiklu ta' ċellula għaċ-ċelluli u għall-kundizzjonijiet tal-kulturi.

1.4.1.3. *Preparazzjoni tal-kulturi*

Linji u tipi ta' Ċelloli stabbiliti: iċ-ċelluli huma mnisslin minn ħażniet ta' kulturi, miżrugħa f'medjum ta' kulturi f'dik id-densità li tiżgura li l-kulturi ma jilħqux konfluwenza qabel il-ħsad, u inkubati f'teperatura ta' 37 °C.

▼B

Limfoċiti: demm sħiħ trattat b'antikoagulant (eż. heparin) jew limfoċiti separati miksubin minn suġġetti b'saħħithom jiżdiedu malmadju tal-kulturi li jkun fih mitoġenu (eż. fitohaemagglutinin) u inkubati f'temperatura ta' 37 ºC.

1.4.1.4. *Attivazzjoni metabolika*

Iċ-ċelluli għandhom jiġu esposti għas-sustanza tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fin-nuqqas ta' sistema xierqa ta' attivazzjoni metabolika. Is-sistema li l-aktar tintuża huja dik tal-cofactor-supplemented post-mitochondrial fraction (S9) preparata mill-fwied ta' annimali gerriema trattat b'aġenti li jġibu l-enżimi bħal ma huma l-Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9), jew taħlita ta' fenobarbitone u β-naftoflavone (10) (11) (12).

Il-frazzjon post-mitochondrial tintuża ġeneralment f'konċentrazzjonijiet fil-medda minn 1-10 % v/v fil-medju finali tat-test. Is-sistema ta' attivazzjoni metabolika tista' tiddependi fuq il-klassi tal-kimika li qed tiġi ttestjata. F'ċerti każijiet jista' jkun xieraq li tintuża aktar minn konċentrazzjoni waħda għall-frazzjon post-mitochondrial.

Numru ta' żviluppi, inkluż il-ħolqien ta' linji ta' Ċelloli ġenetikament iġġenerati li jesprimu enżimi attivanti speċifiċi, jistgħu jkunu ta' potenzal għal attivazzjoni endoġenea. L-għażla tal-linji ta' Ċelloli użati għandha tkun ġustifikata xjentifikament (eż. bir-rilevanza tal-ċitikromu P450 isoenzim għall-metaboliżmu tas-sustanza tat-test).

1.4.1.5. *Sustanza tat-test/Preparazzjoni*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewwbin jew sospiżi f'solventi jew kontenituri xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-Ċelloli. Jistgħu jiżdiedu sustanzi likwidi tat-test direttament mas-sistemi tat-test u/jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda għas-sustanza tat-test kemm-il darba l-informazzjoni dwar l-istabbilità ma turix l-aċċettabbilità tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika bejn is-solvent/mezz u s-sustanza tat-test, u s-solvent/mezz għandu jkun kompatibbli mas-sopravivenza taċ-Ċelloli u l-attività S9. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra minflok dawk l-aktar magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Hu rakkomandat li kemm jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akwuż. Meta jiġu ttestjati sustanzi li mhumiex stabbli fl-ilma, is-solventi organiċi li jintużaw għandhom jkunu mingħajr ilma. L-ilma jista' jitneħħa billi jintuża passatur molekulari.

1.4.2.2. *Konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni*

Fost il-kriterji li għandhom jitqiesu biex tiġi stabbilita l-ogħla konċentrazzjoni hemm iċ-ċitotossiċità, is-solubbilità fis-sistema tat-test u bidliet fil-pH jew osmolalità.

Iċ-ċitossiċità għandha tiġi stabbilita kemm b'attivazzjoni metabolika, kif ukoll mingħajrha, fl-esperiment prinċipali billi tintuża indikazzjoni xierqa ta' l-integrità u tkabbir taċ-Ċelloli, bħal ma huma gradi ta' konfluwenza, għadd ta' Ċelloli vijabbli, jew indiċi mitotiku. Jista' jkun utli li jiġu stabbiliti ċ-ċitossiċità u s-solubbilità f'esperiment preliminari.

▼B

Għandhom jintużaw għall-inqas tliet konċentrazzjonijiet analizzabbli. Fejn ikun hemm iċ-ċitossiċità, dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom ikopru medda mill-massimu għal ftit tossiċità jew xejn; ġeneralment dan ifisser li l-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu separati b'xejn aktar minn fattur bejn 2 u √10. Fiż-żmien tal-ħsad, l-ogħla konċentrazzjoni għandha turi riduzzjoni sinjifikanti fil-livell ta' konfluwenza, fgħadd ta' Ċelloli jew indiċi mitotiku (kollha ogħla minn 50 %). L-indiċi mitotiku huwa biss miżura indiretta ta' l-effetti ċitotossiċi/ċitostatiċi u jiddependi fuq il-ħin wara t-trattament. Madankollu, l-indiċi mitotiku huwa aċċettabbli għal kulturi ta' sospensjoni li fihom qisien tossiċi oħra jistgħu jkunu diffiċli u mhux prattiċi. Bħala informazzjoni supplimentari tista' tintuża informazzjoni dwar kinetika taċ-ċiklu taċ-Ċelloli, bħal ma huwa ż-żmien medju ta' ġenerazzjoni (AGT). Iżda l-AGT huwa medja totali li mhux dejjem tiżvela l-eżistenza ta' subpopolazzjonijiet li għadhom ma jidhrux, u żidiet minimi wkoll fiż-żmien medju ta' ġenerazzjoni jistgħu jiġu assoċjati ma' dewmien sostanzjali fil-ħin ta' l-aħjar riżultati dwar anormalitajiet.

Għal sustanzi li relativament mhumiex ċitotossiċi, l-konċentrazzjoni massima tat-test għandha tkun 5μl/ml, 5 mg/ml jew 0,01 M, liema minnhom ikun l-anqas.

Għal sustanzi li relativament mhumiex solubbli li mhumiex tossiċi f'konċentrazzjonijiet anqas mill-konċentrazzjoni li mhix solubbli, l-ogħla doża li tintuża għandha tkun konċentrazzjoni ogħla mil-limitu ta' solubbilità fil-medjum finali tal-kultura fl-aħħar tal-perjodu ta' trattament. F'ċerti każijiet (eż. meta t-tossiċità tirrikorri biss fuq livell ogħla mill-anqas konċentrazzjoni li mhix solubbli), hu tajjeb li jsir test b'aktar minn konċentrazzjoni waħda bi preċipitazzjoni viżibbli. Jista' jkun utli li ssir stima tas-solubbilità fil-bidu u fl-aħħar tat-trattament, għax is-solubbilità tista' tinbidel waqt l-espożizzjoni fis-sistema tat-test minħabba fil-preżenza ta' Ċelloli, serum S9, eċċ. L-insolubbilità tista' tintnebah bil-vista mingħajr ebda għajnuna. Dak li jippreċipita m'għandux ifixkel l-għadd.

1.4.2.3. *Kontrolli negattivi u pożittivi*

Għandhom jiġu inklużi f'kull esperiment kontrolli pożittivi u negattivi fl-isterss ħin (solvent jew mezz), kemm b'attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha. Meta tintuża l-attivazzjoni metabolika, l-kimika ta' kontroll pożittiv għandha tkun dik li teħtieġ l-attivazzjoni biex tagħti riżultati mutaġeniċi.

Il-kontrolli pożittivi għandhom jagħmlu użu minn elastoġen magħruf f'livelli ta' espożizzjoni li huma mistennija li jagħtu żieda riproduċibbli u li tingħaraf fuq l-isfond li juri s-sensitività tas-sistema tat-test.

Għandhom jingħażlu konċentrazzjonijiet ta' kontrolli pożittivi sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tad-dijappożittivi kodifikati għal min jaqrahom. Eżempji ta' sustanzi pożittivi ta' kontroll jinkludu:

Kondizzjoni ta' attivazzjoni metabolika	Sustanza	Nru SAK	Nru Einecs
Nuqqas ta' attivazzjoni essoġenea metabolika Activation	Metil metanesulfonat	66-27-3	200-625-0
	Etil metanesulfonat	62-50-0	200-536-7

▼B

Kondizzjoni ta' attivazzjoni metabolika	Sustanza	Nru SAK	Nru Einecs
	Etil nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	Mitomiċina	50-07-7	200-008-6
	4-Nitrokwinolina-*N*-ossidu	56-57-5	200-281-1
Preżenza ta' attivazzjoni essoġenea metabolika Activation	Benżo(a)pirene	50-32-8	200-028-5
	Ċiklofosfamid Ċiklofosfamide monojdrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Jistgħu jintużaw sustanzi oħra ta' kontroll pożittiv xieraq. Għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontroll pożittiv li huma relatati mal-klassi tal-kimika, meta dan hu disponibbli.

F'kull żmien ta' ħsad għandhom jiġu inklużi kontrolli negattivi, li jikkonsistu f'soilvent jew mezz biss fil-medjum tat-trattament, u ttrattati bl-istess mod bħal kulturi ta' trattament. Barra minn dan, għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakemm ikun hemm informazzjoni storika ta' kontrolli li turi li ma jkunx hemm effetti ta' ħsara jew mutaġeniċi mill-użu tas-solvent magħżul.

1.4.3. **Proċedura**

1.4.3.1. *Trattament bis-sustanza tat-test*

Celluli li jipproliferaw huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika. It-trattament ta' limfoċiti għandu jibda madwar 487 siegħa wara l-istimulazzjoni mitoġenika.

1.4.3.2. Normalment jintużaw kulturi duplikati f'kull konċentrazzjoni, u dan huwa rakkomandat bil-qawwi għal kulturi ta' kontroll negattiv/-solvent. Billi varjazzjoni minima bejn kulturi duplikati tista' tidher (13) (14), mill-informazzjoni storika, jista' jkun aċċettabbli li jintużaw kulturi singoli f'kull konċentrazzjoni.

Sustanzi gassużi jew volatili għandhom jiġu ttestjati b'metodi xierqa, bħal ma huma mezzi ta' kulturi magħluqin (15) (16).

1.4.3.3. *Żmien tal-ħsad tal-kulturi*

Fl-ewwel esperiment, iċ-Ċelloli għandhom jiġu esposti għas-sustanza tat-test, kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha, għal 3-6 siegħat, u jittieħed kampjun f'ħin ekwivalenti għal madwar 1,5 it-tul taċ-ċiklu ta' ċellula normali wara li jkun beda t-trattament (12). Jekk dan il-protokoll jagħti riżultati negattivi kemm bl-attivazzjoni kif ukoll mingħajrha, għandu jsir esperiment addizzjonali mingħajr attivazzjoni, bi trattament kontinwu sakemm jittieħed kampjun f'ħin ekwivalenti għal 1,5 it-tul taċ-ċiklu ta' ċellula normali. Ċerti kimiċi jistgħu jintnebħu aktar faċilment b'ħinijiet ta' trattament/teħid ta' kampjuni itwal minn 1,5 it-tul taċ-ċiklu. Riżultati negattivi b'attivazzjoni metabolika għandhom jiġu konfermati għal kull każ partikolari. F'dawk il-każijiet fejn mhux meqjus neċessarju li jkun hemm konferma tar-riżultati negattivi, għandha tingħata ġustifikazzjoni.

▼B

1.4.3.4. *Preparazzjoni tal-kromożomi*

Il-kulturi taċ-Ċelloli jiġu ttrattati bi Colcemid® jew kolċiċina normalment għal 1-3 siegħat qabel il-ħsad. Kull kultura ta' ċellula tinħasad u tiġi proċessata separatament għall-preparazzjoni tal-kromożomi. Il-preparazzjoni tal-kromożomi tinvolvi t-trattament ipotoniku ta' Ċelloli, il-fissazzjoni u li jingħataw kulur.

1.4.3.5. *Analiżi*

Id-dijapożittivi kollha, inklużi dawk ta' kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati indipendentement qabel l-analiżi mikroskopika. Peress li l-proċeduri ta' fissazzjoni ta' spiss jirriżultaw fil-ksur ta' għadd ta' Ċelloli metafażiċi bit-telf ta' kromożomi, iċ-Ċelloli li jingħaddu għandu għalhekk ikollhom numru ta' ċentromeri ekwivalenti għan-numru modali ≠ 2 għat-tipi kollha ta' Ċelloli. Għandhom jingħaddu għall-inqas 200 metafaża mifruxa sew għal kull konċentrazzjoni u kontroll, maqsumin b'mod ugwali bejn id-duplikati, jekk ikun applikabbli. Dan in-numru jista' jitnaqqas meta jiġi osservat numru akbar ta' anormalitajiet.

Għalkemm l-għan tat-test huwa biex jinkixfu anormalitajiet strutturali fil-kromożomi, u importanti li wieħed jirreġistra poliplojdi u endoreduplikazzjoni meta wieħed jinduna b'dawn.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

L-unità sperimentali hija ċ-ċellula, u għalhekk għandha ssir valutazzjoni tal-perċentwali ta' Ċelloli b'anormalità (jiet) strutturali fil-kromożomi. Għandhom jiġu elenkati t-tipi differenti ta' anormalitajiet strutturali fil-kromożomi bl-għadd u l-frekwenzi tagħhom għal kulturi ta' esperimenti u ta' kontroll. Il-vojt jiġi reġistrat separatament u jsir rapport dwaru iżda ġeneralment ma jiġix inkluż fil-frekwenza totali ta' l-anormalità.

Għandhom jiġu reġistrati ukoll miżuri ta' ċitotossiċità li jittieħdu fl-istess ħin għall-kulturi kollha ta' kontroll trattati u negattivi fl-esperimenti prinċipali dwar l-anormalitajiet.

Għandha tingħata l-informazzjoni dwar kultura individwali. Barra minn dan, l-informazzjoni għandha tingħata sommarjament f'forma ta' tabella.

Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' riżultat pożittiv ċar. Riżultati ekwivoċi għandhom jiġu ċċarati b'testijiet oħra preferibbilment billi jkun hemm modifika tal-kundizzjonijiet sperimentali. Il-ħtieġa li riżultati negattivi jiġu konfermati ġiet diskussa fi 1.4.3.3. Il-modifika ta' parametri ta' studju biex tiġi estiża l-medda tal-kundizzjonijiet stmati għandha tiġi kkunsidrata f'esperimenti li jsiru wara. Il-parametri ta' studju li jistgħu jiġu modifikati jinkludu l-ispazju tal-konċentrazzjoni u l-kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Hemm ħafna kriterji biex jiġi stabbilit riżultat pożittiv, bħal ma hi żieda relatata mal-konċentrazzjoni jew żieda riproduċibbli f'għadd ta' Ċelloli b'anormalitajiet fil-kromożomi. L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet (3) (13), jistgħu jintużaw metodi ta' statistika.

▼B

L-importanza ta' l-istatistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal riżultat pożittiv. Żieda fin-numru ta' Ċelloli poliplojdi tista' tindika li s-sustanza tat-test għandha l-potenzal li twaqqaf il-proċessi mitotiċi u li twassal għal anormalitajiet numeriċi fil-kromożomi. Żieda fl-għadd ta' ċelluli bi kromożomi endoreduplikati tista' tindika li s-sustanza tat-test għandha l-potenzal li twaqqaf il-progressjoni taċ-ċiklu taċ-Ċelloli (17) (18).

Sustanza ta' test li dwarha r-riżultati ma jilħqux il-kriterji fuq imsemmija titqies bħala mhux mutaġenika f'din is-sistema.

Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività ta' sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ekwivoċi u inċerti irrispettivament min-numru ta' drabi li jirrepeti ruħu l-esperiment.

Ir-riżultati pożittivi minn test *in vitro* ta' anormalitajiet fil-kromożomi jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq anormalitajiet strutturali fil-kromożomi f'Ċelloli somatiċi ta' kulturi ta' mammiferi. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloqx anormalitajiet fil-kromożomi f'Ċelloli somatiċi ta' kulturi ta' mammiferi.

3. RAPPORTAĠĠ

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jkun fih l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz;

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Ċelloli:

— tip u għejun taċ-Ċelloli;

— karatteristiċi karjotipiċi u adattibilità tat-tip ta' ċellula użata;

— nuqqas ta' mikoplasma, jekk ikun applikabbli;

— informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċellula;

— sess ta' min jagħti d-demm, demm sħiħ jew limfoċiti separati, nitroġenu użat;

— numru ta' passaġġi, jekk ikun applikabbli;

— metodi għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-Ċelloli, jekk jkun applikabbli;

— għadd modali ta' kromożomi.

Kundizzjonijiet tat-test:

— identità tas-sustanza li twaqqaf il-metafaża, il-konċentrazzjoni tagħha u kemm iddum l-espożizzjoni taċ-ċellula;

— raġuni prinċipali għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u għadd ta' kulturi inklużi, eż. informazzjoni dwar ċitotossiċità u limitazzjonijiet dwar solubbilità, jekk ikunu disponibbli;

— komposizzjoni tal-medja, konċentrazzjoni CO2 jekk tkun applikabbli;

▼B

— konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— volum tal-mezz u sustanza tat-test miżjuda;

— temperatura ta' l-inkubazzjoni;

— perjodu ta' inkubazzjoni;

— kemm idum it-trattament;

— densità taċ-ċellula fiż-żriegħ, jekk ikun xieraq;

— tip u komposizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika, inklużi krierji ta' aċċettabilità;

— kontrolli pożittivi u negattivi;

— metodi ta' preparazzjoni ta' dijapożitivi;

— kriterji għall-għadd ta' anormalitajiet;

— numru ta' metafażijiet analizzati;

— metodi biex titqies it-tossiċità;

— kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità, eż. grad ta' konfluwenza, informazzjoni dwar iċ-ċiklu taċ-ċellula, għadd ta' Ċelloli, indiċi mitotiku;

— sinjali ta' preċipitazzjoni;

— informazzjoni dwar pH u l-osmolalità tal-medjum tat-trattament, jekk ikun stabbilit;

— definizzjoni għall-anormalitajiet, inkluż il-vojt;

— numru ta' Ċelloli b'anormalitajiet fil-kromożomi u tip ta' anormalitajiet fil-kromożomi mogħtija separatament għal kull kultura trattata u ta' kontroll;

— bidliet fil-plojdi, jekk jidhru;

— relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;

— analiżi statistiċi, jekk ikun hemm;

— informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin negattiv (solvent/mezz) u pożittiv;

— informazzjoni storika dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, bil-meded, mezzi u devjazzjonijiet standard.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(2) Ishidate, M. Jr. and Sofumi, T. (1985), The *In vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.

▼B

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, Environs, Molec. Mutagen 10 (suppl.10), pp. 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, pp. 147-204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation Res., 268, pp. 297-305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, pp. 173-215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/-Carcinogens after Activation in a Mircrosomal System *In vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, Mutation Res., 37, pp. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In vitro*, Mutation Res., 66, pp. 277-290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A. Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J. Fouts, J. R. Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In vitro*Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J. Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994), Report from Working Group on in *In vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, Mutation Res., 312, pp. 241-261.

(13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In vitro* Cytogenetic Assays, in: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J., (cd) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, Mutation Res., 312, pp. 139-149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents, New York, Plenum, pp. 91-103.

▼B

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental Mutagenesis, 5, pp. 795-801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, Mutation Res., 119, pp. 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Res., 43, pp. 1362-1364.

▼B

B.11. **MUTAĠENIĊITÀ -TEST *IN VIVO* DWAR ANORMALITÀ FIL-KROMOŻOMITAL-MUDULLUN TAL-MAMMIFERI**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 475, Test dwar Anormalità fil-Kromożomi tal-Mudullun tal-Mammiferi (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

It-test *in vivo* dwar anormalitajiet fil-kromożomi tal-mammiferi jintuża biex jinstabu anormalitajiet strutturali fil-kromożomi miġjuba mis-sustanza tat-test fiċ-Ċelloli tal-mudullun ta' annimali, normalment annimali gerriema (1) (2) (3)(4). Anormalitajiet strutturali fil-kromożomi jistgħu jkunu ta' żewġ tipi, kromożomi jew kromatidi. Żieda fil-poliplojdi tista' tindika li kimika għandha l-potenzal li ġġib magħha anormalitajiet numeriċi. Fil-maġġoranza ta' mutaġeni kimiċi, anormalitajiet imġiegħela huma tat-tip kromatidu, iżda jirrikorru wkoll anormalitajiet tat-tip ta' kromożomi. Mutazzjonijiet fil-kromożomi u ġrajjiet relatati huma l-kawża ta' ħafna mard ġenetiku fil-bniedem u hemm xhieda sostanzjali li mutazzjonijiet fil-kromożomi u ġrajjiet relatati li jikkawżaw alterazzjonijiet f'onkoġeni u f'ġeni li jrażżnu t-tumuri huma involuti fil-ħolqien tal-kanċer fil-bniedem u sistemi sperimentali.

Annimali gerriema jintużaw ġeneralment f'dan it-test. Il-mudullun huwa t-tessut immirat f'dan it-test, għax huwa tessut vaskularizzat immense, u fih popolazzjoni ta' ċelluli li jiċċiklaw rapidament li jistgħu jkunu faċilment iżolati u proċessati. Speċi oħra u tessuti mmirati mhumiex is-suġġett ta' dan il-metodu.

Dan it-test ta' anormalitajiet fil-kromożomi huwa rilevanti speċjalment fil-valutazzjoni ta' perikli mutaġeniċi għax jippermetti l-kunsiderazzjoni ta' fatturi ta' metaboliżmu *in vivo*, farmakokinetika u proċessi ta' tiswija ta' DNA għalkemm dawn jistgħu jvarjaw fost l-ispeċi u fost it-tessuti. Test *in vivo* huwa utli ukoll għal investigazzjoni ulterjuri ta' effett mutaġeniku żvelat minn test *in vitro*.

Jekk hemm xiedha li s-sustanza tat-test, jew metabolit reattiv, ma jwasslux għat-tessut immirat, mhux xieraq li jintuża dan it-test.

Ara ukoll Introduzzjoni ġenerali Taqsima B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Anormalità tat-tip kromatidu: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-ġdid bejn kromatidi.

Anormalità tat-tip tal-kromożomi: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-ġdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

Endoreduplikazzjoni: proċess li fih wara perjodu S ta' replikazzjoni ta' DNA, in-nukleu ma jispiċċax f'mitożi iżda jerġa' jibda perjodu ieħor S. Ir-riżultat hu kromożomi bi 4, 8, 16,… kromatidi.

Vojt: leżjoni akromatika iżgħar mill-wisgħa ta' kromatid wieħed, u b'misallinjament minimu tal-kromatidi.

Anormalità numerika: bidla fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristku normali ta' Ċelloli utilizzati.

▼B

Poliplojdi: multiplu tan-numru aplojdu ta' kromożomi (*n*) minbarra n-numru diplojdu (jiġifieri 3*n*, 4*n*, eċċetera).

Anormalità strutturali: bidla fl-istruttura tal-kromożomi li wieħed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku ta' l-istadju metafażiku tad-diviżjoni ta' ċelluli, osservati bħala tħassir u biċċiet, bidliet minn ġewwa u bidliet bejniethom.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Annimali huma esposti għas-sustanza tat-test b'rotta xierqa ta' espożizzjoni u huma sakrifikati f'ħinijiet xierqa wara t-trattament. Qabel ma jiġu sakrifikati, l-annimali huma ttrattati b'aġent li jwaqqaf l-metafaži (eż. kolċiċina jew Colcemid®). Imbagħad isiru preparazzjonijiet ta' kromożomi miċ-Ċelloli tal-mudullun u jiġu mtebbgħin, u ċ-ċelluli metafażiċi jiġu analizzati għal anormalitajiet fil-kromożomi.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Selezzjoni ta' l-ispeċi ta' l-annimali*

Normalment jintużaw far, ġrieden u Ħamsters ċiniżi, iżda jista' jintuża kull annimal xieraq ta' l-ispeci tal-mammiferi. Għandhom jintużaw razez, li komunement jintużaw fil-laboratorji, ta' annimali adulti b'saħħithom u żgħar. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali għandha tkun minima u ma teċċedix ± 20 % tal-medja tal-piż ta' kull sess.

1.4.1.2. *Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu*

Għandhom japplikaw il-kundizzjonijiet ġenerali msemmija fl-Introduzzjoni ġenerali għat-Taqsima B iżda l-mira dwar l-umdità għandha tkun 50-60 %.

1.4.1.3. *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Annimali adulti żgħar u b'saħħithom jiġu assenjati mingħajr skema għall-gruppi ta' kontroll u trattament. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li jiġu minimizzati effetti possibbli li jirriżultaw minn kif jitqiegħdu l-gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati wieħed wieħed. L-annimali jiġu akklimatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għall-inqas għal ħamest ijiem.

1.4.1.4. *Preparazzjoni tad-doża*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewwbin jew sospiżi f'solventi jew kontenituri xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament ta' l-annimali. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiġu ttrattati direttament jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda għas-sustanza tat-test kemm-il darba l-informazzjoni dwar l-istabbilità ma turix laċċettabbilità tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Is-solvent/mezz ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doża użata, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanza tat-test. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra minflok dawk l-aktar magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Hu rakkomandat li kemm jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akwuż.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolli*

Għandhom jiġu inklużi għal kull wieħed mis-sessi f'kull test kontrolli pożittivi u negattivi fl-isterss ħin (solvent/mezz). Ħlief għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod bħall-annimali fil-grupp ta' trattament.

Il-kontrolli pożittivi għandhom jipproduċu anormalitajiet strutturali *in vivo* f'livelli ta' espożizzjoni li huma mistennija li jagħtu żieda li tkun tidher fuq l-isfond. Trattamenti ta' kontroll pożittiv għandhom jingħażlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx l-identità tad-dijapożitivi kodifikati lil min jaqrahom. Huwa aċċettat li l-kontroll pożittiv jiġi somministrat minn rotta differenti minn dik tas-sustanza tat-test u jittieħed kampjun darba waħda biss. Jista' jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontroll pożittivi relatati mal-klassi ta' kimiċi, meta dawn ikunu disponibbli. Eżempji ta' sustanzi ta' kontroll pożittivi jinkludu:

Sustanza	Nru SAK	Nru EINECS
Etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
Etil nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomiċina C	50-07-7	200-008-6
Ciklofosfamide Ciklofosfamide monojdrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trijetilenemelamina	51-18-3	200-083-5

Il-kontrolli negattivi, trattati biss bis-solvent jew bil-mezz, u mod ieħor trattati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, għandhom jiġu inklużi għal kull perjodu ta' teħid ta' kampjuni, sakemm ma jkunux disponibbli varjabbilità aċċettabbli bejn l-annimali u frekwenżi ta' Ċelloli b'anormalitajiet fil-kromożomi mill-informazzjoni storika tal-kontroll. Jekk jiġi applikat it-teħid ta' kampjun singolu, l-aktar żmien xieraq huwa l-ewwel darba li jittieħed il-kampjun. Barra minn dan, għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakemm ma jkunx hemm informazzjoni ta' kontroll pubblikata u storika li turi li jkun hemm effetti ta' ħsara u mutaġeniċi bl-uzu tas-solvent/mezz magħżul.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Numru u sess ta' l-annimali**

Kull grupp ta' trattament u ta' kontroll għandu jinkludi fih għall-inqas ħames annimali analizzabbli għal kull sess. Jekk fiż-żmien ta' l-istudju jkun hemm informazzjoni disponibbli minn studji fl-istess speċi u bl-użu ta' l-istess rotta ta' espożizzjoni li juru li ma hemm l-ebda differenzi sostanzjali fit-tossiċità bejn is-sessi, allura jkun suffiċjenti li l-ittestjar isir fuq sess wieħed. Fejn l-espożizzjoni umana għall-kimiċi tista' tiddependi fuq is-sess, bħal per eżempju b'ċerti aġenti farmaċewtiċi, it-test għandu jitwettaq b'annimali tas-sess xieraq.

1.5.2. **Skeda tat-trattament**

Is-sustanzi tat-test huma preferibbilment somministrati bħala trattament singolu. Is-sustanzi tat-test jistgħu wkoll jiġu somministrati bħala doża maqsuma, jiġifieri żewġ trattamenti fl-istess ġurnata separati b'mhux aktar minn ftit sigħat, biex tiġi faċilitata s-somministrazzjoni ta' volum qawwi ta' materjal. Reġimi ta' doži oħra għandhom ikunu ġustifikati xjentifikament.

▼B

Il-kampjuni għandhom jittieħdu f'żewġ ħinijiet separati wara t-trattament f'ġurnata waħda. Għal annimali ġerriema l-ewwel intervall bejn it-teħid ta' kampjuni huwa ta' tul ta' 1,5 iċ-ċiklu normali ta' ċellula (dan ta' l-aħħar huwa normalment ta' 12-18-il siegħa) wara t-trattament. Ladarba l-ħin meħtieġ għall-bidu u l-metaboliżmu tas-sustanza tat-test kif ukoll l-effetti tiegħu fuq il-kinetika taċ-ċikli taċ-Ċelloli jistgħu jaffettwaw iż-żmien ottimali biex wieħed jintnebaħ bl-anormalitajiet fil-kromożomi, huwa rakkomandat li jittieħed kampjun ieħor 24 siegħa wara li jkun ttieħed l-ewwel kampjun. Jekk jintużaw metodi ta' dożi ta' aktar minn ġurnata waħda, għandu jkun hemm ħin ta' teħid ta' kampjun wieħed f'tulijiet ta' 1,5 iċ-ċikli normali ta' ċellula wara l-aħħar trattament.

Qabel is-sagrifiċċju, l-annimali huma injettati intraperitonalment b'doża xierqa ta' aġent li jwaqqaf l-metafaża (eż. Colcemid® jew kolċiċina). Wara dan, jittieħed kampjun mill-annimali f'intervalli xierqa. Għall-ġrieden dan l-intervall huwa ta' madwar 3-5 siegħat; għal Ħamsters ċiniżi dan l-intervall huwa ta' madwar 4-5 siegħat. Iċ-Ċelloli jinħasdu mill-mudullun u jiġu analizzati għal anormalitajiet fil-kromożomi.

1.5.3. **Livelli ta' doża**

Jekk jitwettaq studju biex tiġi skoperta l-medda għax ma jkunx hemm disponibbli informazzjoni xierqa, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, jintużaw l-istess speċi, razza, sess u metodu ta' trattament li għandhom jintużaw fl-istudju prinċipali (5). Jekk ikun hemm tossiċità, jintużaw tliet livelli ta' doża għall-ewwel perjodu ta' teħid ta' kampjuni. Dawn il-livelli ta' doża għandhom jkopru medda mill-massimu għal ftit jew l-ebda tossiċità. L-ogħla doża hija mfissra bħala s-sinjali ta' tossiċità li jipproduċu d-doża hekk li livelli ogħla tad-doża, bbażati fuq l-istess reġim ta' dożaġġ, huma mistennija li jikkawżaw il-mewt. Is-sustanzi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi baxxi mhux tossiċi (bħal ma huma ormoni u nitroġeni) jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' l-issettjar tad-doża u għandhom jiġu valutati fuq bażi ta' każ b'każ. L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fil-mudullun (eż. ogħla minn riduzzjoni ta' 50 % fl-indiċi mitotiku).

1.5.4. **Test tal-limitu**

Jekk test ta' doża waħda ta' livell ta' għall-inqas 2 000 mg/kg piż tal-ġisem meta jitwettaq trattament wieħed, jew bħala żewġ trattamenti fl-istess ġurnata, ma jipproduċix effetti tossiċi li wieħed jinduna bihom, u jekk ma tkun mistennija l-ġenotossiċità fuq il-bażi ta' l-informazzjoni minn sustanzi strutturalment relatati, allura ma jitqiesx li jkun neċessarju li jsir studju komplet bl-użu ta' tliet livelli ta' dożaġġ. Għal studji li jdumu aktar, il-limitu tad-doża huwa 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum għal trattament sa 14-il ġurnata, u 1 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum għal trattament ta' aktar minn 14-il ġurnata. L-espożizzjoni umana mistennija tista' tindika l-ħtieġa ta' livell ogħla ta' doża li għandu jintuża fit-test tal-limitu.

1.5.5. **Somministrazzjoni ta' dożi**

Normalment is-sustanza tat-test tiġi somministrata b'gavage billi jintuża tubu għall-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni, jew bl-injezzjoni intraperitonali. Fejn ikunu ġustifikati, jistgħu jiġu aċċettati rotot oħra ta' espożizzjoni. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jiġi somministrat b'gavage jew b'injezzjoni f'ħin wieħed jiddependi fuq il-qies ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 2 ml/100g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ogħla minn dawn għandu jkun ġustifikat. Ħlief fil-każ ta' sustanzi li jirritaw jew korrożivi li normalment juru effetti aggravati b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbilita fil-volum tat-test għandha titnaqqas bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fuq il-livelli kollha tad-doża.

▼B

1.5.6. **Preparazzjoni tal-kromożomi**

Minnufih wara s-sagrifiċċju, il-mudullun jiġi miksub, espost għal soluzzjoni ipotonika u ffissat. Iċ-Ċelloli imbagħad jinfirxu fuq dijapożitivi u jingħataw kulur.

1.5.7. **Analiżi**

L-indiċi mitotiku għandu jiġi stabbilit bħala miżura ta' ċitotossiċita f'għall-inqas 1 000 ċellula għal kull annimal għal kull annimal trattat (inklużi kontrolli pożittivi) u annimali kontrollati negativament mhux trattati.

Għandhom jiġu analizzati għall-inqas 100 ċellula għal kull annimal. Dan in-numru jista' jitnaqqas meta jiġi nnotat għadd kbir ta' anormalitajiet. Id-dijapożitivi kollha, inklużi dawk ta' kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati indipendentement qabel l-analiżi mikroskopika. Billi l-proċeduri tal-preparazzjoni ta' dijapożitivi jirriżultaw ħafna drabi fil-ksur ta' għadd ta' metafaži bit-telf ta' kromożomi, iċ-Ċelloli li jingħaddu għandu għalhekk ikun fihom numru ta' ċentromeri ugwali għan-numru 2n ± 2.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR- RIŻULTATI

L-informazzjoni dwar annimali individwali għandha tingħata f'forma ta' tabella. L-unità sperimentali hija l-annimal. Għal kull annimal għandhom jiġu valutati n-numru ta' Ċelloli li jingħaddu, in-numru ta' anormalitajiet f'kull ċellula u l-perċentwali ta' Ċelloli b'anormalità (jiet) strutturali fil-kromożomi. Għandhom jiġu elenkati t-tipi differenti ta' anormalitajiet strutturali fil-kromożomi bl-għadd u l-frekwenzi tagħhom għal gruppi ta' trattament u ta' kontroll. Il-vojt jiġi reġistrat separatament u jsir rapport dwaru iżda ġeneralment ma jiġix inkluż fil-frekwenza totali ta' l-anormalità. Jekk ma hemmx xiehda ta' differenza fir-riżultat bejn iż-żewġ sessi, l-informazzjoni dwar iż-żewġ sessi tista' tingħaqad għall-analiżi statistika.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Hemm ħafna kriterji biex jiġi stabbilit riżultat pożittiv, bħal ma hi żieda relatata mad-doża fl-għadd relattiv ta' Ċelloli b'anormalitajiet fil-kromożomi jew żieda ċara fin-numru ta' Ċelloli b'anormalitajiet fi grupp singolu ta' trattament fi żmien singolu ta' teħid ta' kampjuni. L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet (6), jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. L-importanza ta' l-istatistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal riżultat pożittiv. Riżultati ekwivoċi għandhom jiġu ċċarati b'testijiet ulterjuri preferibilment billi tintuża modifika tal-kundizzjonijiet ta' l-esperiment.

Żieda fil-poliplojdi tista' tindika li s-sustanza tat-test għandha l-potenzal li twassal għal anormalitajiet numeriċi fil-kromożomi. Żieda fl-endoreduplikazzjoni tista' tindika li s-sustanza tat-test għandha l-potenzal li twaqqaf il-progressjoni taċ-ċiklu taċ-Ċelloli (7) (8).

Sustanza ta' test li dwarha r-riżultati ma jilħqux il-kriterji fuq imsemmija titqies bħala mhux mutaġenika f'dan it-test.

▼B

Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività ta' sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ekwivoċi u inċerti irrispettivament min-numru ta' drabi li jirrepeti ruħu l-esperiment.

Ir-riżultati pożittivi minn test *in vivo* ta' anormalitajiet fil-kromożomi jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq anormalitajiet strutturali fil-kromożomi fil-mudullun ta' l-ispeċi ttestjata. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloqx anormalitajiet fil-mudullun ta' l-ispeċi ttestjata.

Għandha tiġi diskussa l-probabilità li s-sustanza tat-test jew il-metaboliti tagħha jilħqu ċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew speċifikatament it-tessut immirat (eż. tossiċità sistemika).

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jkun fih l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz;

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Annimali ttestjati:

— speċi/razza użati;

— numru, età u sess ta' l-annimali;

— għejun, kundizzjonijiet dwar fejn jinżammu, dieta, eċċ.;

— piż individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test, inkluża l-medda ta' piż tal-ġisem, mezzi u devjazzjoni standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

— kontrolli pożittivi u negattivi (mezz/solvent);

— informazzjoni mill-istudju dwar il-medda, jekk ikun sar;

— raġuni prinċipali għall-għażla tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test;

— dettalji dwar is-somministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— raġuni prinċipali dwar ir-rotta ta' somministrazzjoni;

— metodi biex jiġi verifikat li s-sustanza tat-test waslet għaċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew it-tessut immirat;

— konverżjoni mill-konċentrazzjoni (ppm) tas-sustanza tat-test dieta/ilma għax-xorb għad doża attwali (mg/kg piż tal-ġisem/jum) jekk tkun applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata dwar l-iskedi ta' trattament u teħid ta' kampjuni;

— metodi biex titqies it-tossiċità;

▼B

— identità tas-sustanza li twaqqaf il-metafaži, il-konċentrazzjoni tagħha u kemm idum it-trattament;

— metodi tal-preparazzjoni tad-dijapożitivi;

— kriterji għall-għadd ta' anormalitajiet;

— numru ta' Ċelloli analizzati kull annimal;

— kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità;

— indiċi mitotiku;

— tip u numru ta' anormalitajiet, mogħtija separatament għal kull annimal;

— numru totali ta' anormalitajiet għal kull grupp bil-mezzi u devjazzjonijiet standard;

— numru ta' Ċelloli b'anormalitajiet f'kull grupp bil-mezzi u devjazzjonijiet standard;

— bidliet fil-plojdi, jekk jidhru;

— relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;

— analiżi statistiċi, jekk ikun hemm;

— informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin negattiv;

— informazzjoni storika dwar kontroll negattiv (solvent/mezz), bil-meded, mezzi u devjazzjonijiet standard;

— informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin pożittiv.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, S. Venitt and J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, Mutation Res., 189, pp. 157-165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregaro, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *in vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, Mutation Res., 312, pp. 305-312.

(5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.

▼B

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, D. J. Kirkland (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha- radiation-induced G2 arrest, Mutation Res., 119, pp. 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Res., 43, pp. 1362-1364.

▼B

B.12. MUTAĠENIĊITÀ-TEST MIKRONUKLEU *IN VIVO* GĦAL ERITROĊITE FIL-MAMMIFERI

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 474, Test Mikronukleu għal Eritroċite fil-Mammiferi (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

It-test mikronukleu *in vivo* fil-mammiferi jintuża biex jinstab jekk hemmx ħsara li tinġieb mis-sustanza tat-test lill-kromożomi jew l-apparat mitotiku ta' eritroblasti bl-analiżi ta' eritroċiti meħuda bħala kampjuni fil-mudullun u/jew Ċelloli periferali tad-demm ta' annimali, ġeneralment annimali gerriema.

L-għan tat-test mikronukleu huwa biex jiġu identifikati sustanzi li jikkawżaw ħsara ċitoġenetika li tirriżulta fil-formazzjoni ta' mikronukleji li jkun fihom biċċiet ta' residwi ta' kromożomi jew kromożomi sħaħ.

Meta eritroblast tal-mudullun jiżviluppa f'eritroċite polikromatika, joħroġ in-nukleu prinċipali; kull mikronukleu li jkun ġie ffurmat jista' jibqa' lura fiċ-ċitoplasma mod ieħor anukleat. Il-viżwalizzazzjoni tal-mikronukleji hija faċilitata f'dawn iċ-Ċelloli għax ma għandhomx nukleu prinċipali. Żieda fil-frekwenza ta' eritroċiti polikromatiċi mikronukleati fl-annimali trattati hija indikazzjoni ta' ħsara miġjuba fil-kromożomi.

Ġeneralment f'dan it-test jiġi użat il-mudullun ta' annimali gerriema għax l-eritroċiti polikromatiċi huma prodotti f'dak it-tessut. Il-qisien ta' eritroċiti mikronukleati immaturi (polikromatiċi) fid-demm periferali huwa ugwalment aċċettat f'kull speċi li fiha ġiet murija l-inabbiltà tal-milsa li tneħħi eritroċiti mikronukleati, jew li tkun uriet sensittività adegwata biex tiskopri aġenti li jikkawżaw anormalitajiet fil-kromożomi strutturali jew numeriċi. Il-mikronukleji jistgħu differenzati b'għadd ta' kriterji. Dawn jinkludu l-identifikazzjoni tal-preżenza jew nuqqas ta' DNA kinetoċoru jew ċentromeriku fil-mikronukleji. Il-frekwenza ta' eritroċiti mikronukleati immaturi (polikromatiċi) hija l-punt prinċipali ta' konklużjoni. L-għadd ta' eritroċiti maturi (normokromatiċi) fid-demm periferali li jkun fihom mikronukleji fost numru stabbilit ta' eritroċiti maturi jista' jintuża ukoll bħala l-punt ta' konklużjoni tal-valutazzjoni meta l-annimali jiġu ttrattati għal erba' ġimgħat jew aktar.

Dan it-test mikronukleu *in vivo* fil-mammiferi huwa speċjalment rilevanti fil-valutazzjoni ta' perikli mutaġeniċi għax jippermetti l-kunsiderazzjoni ta' fatturi ta' metaboliżmu *in vivo*, farmakokinetika u proċessi ta' tiswija tad-DNA għalkemm dawn jistgħu jvarjaw fost l-ispeċi, fost it-tessuti u fost il-punti ġenetiċi ta' konklużjoni. Eżami *in vivo* huwa utli ukoll għal investigazz ulterjuri ta' effett mutaġeniku żvelat b'sistema *in vitro*.

Jekk ikun hemm xiedha li s-sustanza tat-test, jew metabolit reattiv, ma jilħaqx it-tessut immirat, mhux xieraq li jintuża dan it-test.

Ara ukoll l-Introduzzjoni ġenerali Taqsima B.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ċentromeru (Kinetoċoru): reġjun(i) ta' kromożomu li magħha huma assoċjati fibri irqaq waqt d-diviżjoni taċ-ċellula, li jippermettu l-moviment b'ċertu ordni ta' kromożomi sekondarji għat-truf ta' Ċelloli sekondarji.

Mikronukleji: nukleji żgħar, separate minn u addizzjonali għan-nukleji prinċipali ta' Ċelloli, prodotti waqt it-telofaži ta' mitoži (mejoži) permezz ta' biċċiet ta' residwi ta' kromożomi jew kromożomi sħaħ.

Eritroċite normokromatika: eritroċite matura li ma għandhiex ribosomi u li tista' tiġi differenzata minn eritroċiti polikromatiċi immaturi bit-tebgħat selettivi għal ribosomi.

Entroċite polikromatika: eritroċite immatura, fi stadju intermedju ta' żvilupp, li xorta waħda fiha ribosomi u għalhekk tista' tiġi differenzata minn eritroċiti normokromatiċi maturi bit-tebgħat selettivi għal ribosomi.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

L-annimali huma esposti għas-sustanza tat-test permezz ta' rotta xierqa. Jekk jintuża l-mudullun, l-annimali jiġu sakrifikati fi żminijiet xierqa wara t-trattament, jitneħħa l-mudullun, u l-preparazzjonijiet jsiru u jingħataw il-kulur (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Meta jintuża demm periferali, id-demm jinġabar f'ħinijiet xierqa wara t-trattament u wara li jsiru l-preparazzjonijiet u jingħataw il-kulur (4) (8) (9) (10). Għal studji b'demm periferali, għandu jgħaddi perjodu kemm jista' jkun żgħir bejn l-aħħar espożizzjoni u l-ħsad taċ-ċellula. Il-preparazzjonijiet jiġu analizzati għall-preżenza ta' mikronukleji.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Għażla ta' l-ispeċi ta' l-annimali*

Hu rakkomandat li jintużaw ġrieden jew far, jekk jintuża l-mudullun, iżda jista' jintuża kull annimal xieraq ta' l-ispeci tal-mammiferi. Meta jintuża demm periferali, hu rakkomandat li jintużaw ġrieden. Iżda kull speċi xierqa ta' mammiferi tista' tintuża sakemm tkun speċi li fiha l-milsa ma tneħħix eritroċiti mikronukleati, jew speċi li tkun uriet sensittività adegwata biex tiskopri aġenti li jikkawżaw anormalitajiet fil-kromożomi strutturali jew numeriċi. Għandhom jintużaw razez, li komunement jintużaw fil-laboratorji, ta' annimali adulti b'saħħithom u żgħar. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali għandha tkun minima u ma teċċedix ± 20 % tal-medja tal-piż ta' kull sess.

1.4.1.2. *Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu*

Għandhom japplikaw il-kundizzjonijiet ġenerali msemmija fl-Introduzzjoni ġenerali għat-Taqsima B iżda l-mira dwar l-umdità għandha tkun 50-60 %.

▼B

1.4.1.3. *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Annimali adulti żgħar u b'saħħithom jiġu assenjati mingħajr skema għall-gruppi ta' kontroll u trattament. L-annimali jiġu identifikati wieħed wieħed. L-annimali jiġu akklimatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għall-inqas għal ħamest ijiem.. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li jiġu minimizzati effetti possibbli li jirriżultaw minn kif jitqiegħdu l-gaġeġ.

1.4.1.4. *Preparazzjoni tad-doża*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewwbin jew sospiżi f'solventi jew kontenituri xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament ta' l-annimali. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiġu ttrattati direttament jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda għas-sustanza tat-test kemm-il darba l-informazzjoni dwar l-istabbilità ma turix laċċettabbilità tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Is-solvent/mezz ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doża użata, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanza tat-test. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra minflok dawk l-aktar magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Hu rakkomandat li kemm jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akwuż.

1.4.2.2. *Kontrolli*

Għandhom jiġu inklużi għal kull wieħed mis-sessi f'kull test kontrolli pożittivi u negattivi fl-isterss ħin (solvent/mezz). Ħlief għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod bħall-annimali fil-gripp ta' trattament.

Il-kontrolli pożittivi għandhom jipproduċu mikronukleji *in vivo* f'livelli ta' espożizzjoni li huma mistennija li jagħtu żieda li tkun tidher fuq l-isfond. Trattamenti ta' kontroll pożittiv għandhom jingħażlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx l-identità tad-dijapożitivi kodifikati lil min jaqrahom. Huwa aċċettat li l-kontroll pożittiv jiġi somministrat minn rotta differenti minn dik tas-sustanza tat-test u jittieħed kampjun darba waħda biss. Barra minn dan, jista' jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontroll pożittivi relatati mal-klassi ta' kimiċi, meta dawn ikunu disponibbli. Eżempji ta' sustanzi ta' kontroll pożittivi jinkludu:

Sustanza	Nru SAK	Nru Einecs
Etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-etil-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomiċina C	50-07-7	200-008-6
Ciklofosfamide ciklofosfamide monojdrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trijetilenemelamina	51-18-3	200-083-5

▼B

Il-kontrolli negattivi, trattati biss bis-solvent jew bil-mezz, u mod ieħor trattati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, għandhom jiġu inklużi għal kull perjodu ta' teħid ta' kampjuni, sakemm ma jkunux disponibbli varjabbilità aċċettabbli bejn l-annimali u frekwenżi ta' Ċelloli b'mikronuleji mill-informazzjoni storika tal-kontroll. Jekk jiġi applikat it-teħid ta' kampjun singolu, l-aktar żmien xieraq huwa l-ewwel darba li jittieħed il-kampjun. Barra minn dan, għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakemm ma jkunx hemm informazzjoni ta' kontroll pubblikata u storika li turi li jkun hemm effetti ta' ħsara u mutaġeniċi bl-uzu tas-solvent/mezz magħżul.

Jekk jintuża demm periferali, ħampjun ta' qabel it-trattament jista' jkun aċċettabbli bħala kontroll negattiv fl-istess ħin, iżda fi studji qosra ta' demm periferali biss (eż. 1-3 trattament(i)) meta l-informazzjoni li tirriżulta tkun fil-medda mistennija għall-kontroll storiku.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Numru u sess ta' l-annimali**

Kull grupp ta' trattament u ta' kontroll għandu jinkludi fih għall-inqas ħames annimali analizzabbli għal kull sess (11). Jekk fiż-żmien ta' l-istudju jkun hemm informazzjoni disponibbli minn studji fl-istess speċi u bl-użu ta' l-istess rotta ta' espożizzjoni li juru li ma hemm l-ebda differenzi sostanzjali fit-tossiċità bejn is-sessi, allura jkun suffiċjenti li l-ittestjar isir fuq sess wieħed. Fejn l-espożizzjoni umana għall-kimiċi tista' tiddependi fuq is-sess, bħal per eżempju b'ċerti aġenti farmaċewtiċi, it-test għandu jitwettaq b'annimali tas-sess xieraq.

1.5.2. **Skeda tat-trattament**

Ma jista' jiġi rakkomandat l-ebda trattament standard (jiġifieri trattament wieħed, żewġ trattament jew aktar b'intervalli ta' 24 siegħa). Il-kampjuni minn reġimi ta' dożi estiżi huma aċċettabbli sakemm ikun ġie muri effett pożittiv għal dan l-istudju jew, għal studju negattiv, sakemm tkun ġiet murija tossiċità sakemm tintuża d-doża sal-limitu, u tingħata doża sal-ħin tat-teħid ta' kampjuni. Is-sustanzi tat-test jistgħu ukoll jiġu somministrati bħala doża maqsuma, jiġifieri żewġ trattament fl-istess ġurnata separati b'mhux aktar minn ftit sigħat, biex tiġi faċilitata s-somministrazzjoni ta' volum kbir ta' materjal.

It-test jista' jsir f'żewġ modi:

(a) l-annimali jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test darba. Il-kampjuni tal-mudullun jittieħdu għall-inqas darbtejn, l-ewwel wieħed mhux qabel 24 siegħa wara t-trattament, iżda mhux aktar minn 48 siegħa wara t-trattament b'intervalli xierqa bejn it-teħid ta' kampjuni. It-teħid ta' kampjuni qabel 24 siegħa wara t-trattament għandu jkun ġustifikat. Il-kampjuni ta' demm periferali jittieħdu għall-inqas darbtejn, l-ewwel wieħed mhux qabel 36 siegħa wara t-trattament, b'intervalli xierqa wara t-teħid ta' l-ewwel kampjun, iżda mhux aktar minn 72 siegħa. Meta jiġi rikonoxxut riżultat pożittiv wara t-teħid wieħed ta' kampjuni, ma jkunx meħtieġ aktar teħid ta' kampjuni;

▼B

(b) Jekk jintużaw żewġ trattament jew aktar kuljum (eż. żewġ trattamenti jew aktar f'intervalli ta' 24 siegħa), għandhom jingabru kampjuni darba bejn 18 u 24 siegħa wara l-aħħar trattament riward il-mudullun u darba bejn 36 u 48 siegħa wara l-aħħar trattament rigward demm periferali (12).

Jistgħu jintużaw metodi oħra ta' teħid ta' kampjuni, fejn dawn ikunu rilevanti.

1.5.3. **Livelli ta' doża**

Jekk jitwettaq studju biex tiġi skoperta l-medda għax ma jkunx hemm disponibbli informazzjoni xierqa, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, jintużaw l-istess speċi, razza, sess u metodu ta' trattament li għandhom jintużaw fl-istudju prinċipali (13). Jekk ikun hemm tossiċità, jintużaw tliet livelli ta' doża għall-ewwel perjodu ta' teħid ta' kampjuni. Dawn il-livelli ta' doża għandhom jkopru medda mill-massimu għal ftit jew l-ebda tossiċità. Fil-ħin ta' l-aħħat teħid ta' kampjuni, l-ogħla doża biss hi meħtieġa li tintuża. L-ogħla doża hija mfissra bħala d-doża li tipproduċi sinjali ta' tossiċità hekk li livelli ogħla tad-doża, bbażati fuq l-istess reġim ta' dożaġġ, huma mistennija li jikkawżaw il-mewt. Is-sustanzi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi baxxi mhux tossiċi (bħal ma huma ormoni u nitroġeni) jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' l-issettjar tad-doži u għandhom jiġu valutati fuq bażi ta' każ b'każ. L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fil-mudullun (eż. tnaqqis fil-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali fil-mudullun jew demm periferali).

1.5.4. **Test tal-limitu**

Jekk test ta' doża waħda ta' livell ta' għall-inqas 2 000 mg/kg piż tal-ġisem meta jitwettaq trattament wieħed, jew bħala żewġ trattamenti fl-istess ġurnata, ma jipproduċix effetti tossiċi li wieħed jinduna bihom, u jekk ma tkunx mistennija l-ġenotossiċità fuq il-bażi ta' l-informazzjoni minn sustanzi strutturalment relatati, allura ma jitqiesx li jkun neċessarju li jsir studju komplet bl-użu ta' tliet livelli ta' dożaġġ. Għal studji li jdumu aktar, il-limitu tad-doża huwa 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum għal trattament sa 14-il ġurnata, u 1 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum għal trattament ta' aktar minn 14-il ġurnata. L-espożizzjoni umana mistennija tista' tindika l-ħtieġa ta' livell ogħla ta' doża li għandu jintuża fit-test tal-limitu.

1.5.5. **Somministrazzjoni ta' doži**

Normalment is-sustanza tat-test tiġi somministrata b'gavage billi jintuża tubu għall-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni, jew bl-injezzjoni intraperitonali. Fejn ikunu ġustifikati, jistgħu jiġu aċċettati rotot oħra ta' espożizzjoni. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jiġi somministrat b'gavage jew b'injezzjoni f'ħin wieħed jiddependi fuq il-qies ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 2 ml/100g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ogħla minn dawn għandu jkun ġustifikat. Ħlief fil-każ ta' sustanzi li jirritaw jew korroživi li normalment juru effetti aggravati b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbilità fil-volum tat-test għandha titnaqqas bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fuq il-livelli kollha tad-doża.

▼B

1.5.6. **Preparazzjoni tal-mudullun/demm**

Iċ-Ċelloli tal-mudullun ġeneralment jinkisbu mill-wirk jew mill-qasba tas-sieq minnufih wara s-sagrifiċċju. Komunement, iċ-ċelluli jitneħħew mill-wirk jew mit-qasba tas-sieq, preparati u mogħtija kulur permezz ta' metodi stabbiliti. Demm periferali jinkiseb mill-vina tad-denb jew arterja/vina oħra xierqa. Iċ-Ċelloli tad-demm huma minnufih mogħtija kulur supravitalment (8) (9) (10) jew isiru preparazzjonijiet biex jingħataw il-kulur. L-użu ta' kulur speċifiku ta' DNA (eż. oranġjo akridin (14) jew Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) jista' jelimina xi uħud mill-prodotti assoċjati ma' l-użu ta' kulur mhux speċifiku DNA. Dan il-vantaġġ ma jipprekludix l-użu ta' kuluri konvenzjonali (eż. Giemsa). Jistgħu jintużaw ukoll sistemi addizzjonali (eż. kolonni ta' ċelluloża biex jitneħħu Ċelloli nukleati (16)) iżda dawn is-sistemi intwerew li jaħdmu adegwatament għall-preparazzjoni ta' mikronukleji fil-laboratorju.

1.5.7. **Analiżi**

Il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali (immaturi + maturi) tiġi stabbilita għal kull annimal billi jingħaddu għall-inqas 200 eritroċiti għall-mudullun u 1 000 eritroċiti għad-demm periferali (17). Id-dijapożitivi kollha, inklużi dawk ta' kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati indipendentement qabel l-analiżi mikroskopika. Jingħaddu għall-inqas 2 000 eritroċiti immaturi għall-inċidenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati. Tista' tinkiseb iktar informazzjoni billi jingħaddu eritroċiti maturi għal mikronukleji. Meta jiġu analizzati d-dijapożitivi, il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali ma għandhiex tkun inqas minn 20 % tal-valur ta' kontroll. Meta l-annimali jiġu ttrattati kontinwament għal erba' ġimgħat jew aktar, jistgħu jingħaddu ukoll għall-inqas 2 000 eritroċiti maturi għal kull annimal għall-inċidenza ta' mikronukleji. Is-sistemi ta' analiżi awtomatizzata (analiżi ta' l-immaġini u analiżi tal-fluss ċitometriku ta' sospensjonijiet ta' Ċelloli) huma aċċettabbli bħala alternattivi għall-valutazzjoni manwali jekk ikunu ġustifikati u validati kif xieraq.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

L-informazzjoni dwar annimali individwali għandha tingħata f'forma ta' tabella. L-unità sperimentali hija l-annimal. Għal kull annimal li jiġi analizzat għandhom jiġu elenkati separatament in-numru ta' eritroċiti immaturi li jingħaddu, in-numru ta' eritroċiti immaturi mikronukleati, u n-numru ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali. Meta l-annimali jiġu ttrattati kontinwament għal erba' ġimgħat jew aktar, għandha tingħata wkoll l-informazzjoni dwar l-eritroċiti maturi jekk din tinġabar. Għal kull annimal tingħata l-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali u, jekk jitqies applikabbli, il-perċentwali ta' eritroċiti mikronukleati. Jekk ma hemmx xiehda ta' differenza fir-riżultat bejn iż-żewġ sessi, l-informazzjoni dwar iż-żewġ sessi tista' tingħaqad għall-analiżi statistika.

▼B

2.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Hemm ħafna kriterji biex jiġi stabbilit riżultat pożittiv, bħal ma hi żieda relatata mad-doża fl-għadd relattiv ta' Ċelloli mikronukleati jew żieda ċara fin-numru ta' Ċelloli mikronukleati fi grupp singolu ta' trattament fi żmien singolu ta' teħid ta' kampjuni. L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet (18) (19), jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. L-importanza ta' l-istatistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal riżultat pożittiv. Riżultati ekwivoċi għandhom jiġu ċċarati b'testijiet ulterjuri preferibilment billi tintuża modifika tal-kundizzjonijiet ta' l-esperiment.

Sustanza ta' test li dwarha r-riżultati ma jilħqux il-kriterji fuq imsemmija titqies bħala mhux mutaġenika f'dan it-test.

Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività ta'

sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ekwivoċi u inċerti irrispettivament min-numru ta' drabi li jirrepeti ruħu l-esperiment. Ir-riżultati pożittivi minn test mikronukleu jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq mikronukleji li huma r-riżultat ta' ħsara fil-kromożomi jew ħsara lill-apparat mitotiku fl-eritroblasti ta' l-ispeċi ttestjata. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloqx mikronukleji fl-eritroċiti immaturi ta' l-ispeċi ttestjata.

Għandha tiġi diskussa l-probabilità li s-sustanza tat-test jew il-metaboliti tagħha jilħqu ċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew speċifikatament it-tessut immirat (eż. tossiċità sistemika).

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz;

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Annimali ttestjati:

— speċi/razza użati,

— numru, età u sess ta' l-annimali;

— għejun, kundizzjonijiet dwar fejn jinżammu, dieta, eċċ.;

— piż individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test, inkluża l-medda ta' piż tal-ġisem, mezzi u devjazzjoni standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

— kontrolli pożittivi u negattivi (mezz/solvent);

— informazzjoni mill-istudju dwar il-medda, jekk ikun sar;

▼B

— raġuni prinċipali għall-għażla ta' livell tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test;

— dettalji dwar is-somministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— raġuni prinċipali dwar ir-rotta ta' somministrazzjoni;

— metodi biex jiġi verifikat li s-sustanza tat-test waslet għaċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew it-tessut immirat, jekk tkun applikabbli;

— konverżjoni mill-konċentrazzjoni (ppm) tas-sustanza tat-test dieta/ilma għax-xorb għad doża attwali (mg/kg piż tal-ġisem/jum) jekk tkun applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata dwar l-iskedi ta' trattament u teħid ta' kampjuni;

— metodi tal-preparazzjoni tad-dijapożitivi;

— metodi biex titqies it-tossiċità;

— kriterji għall-għadd ta' eritroċiti immaturi mikronukleati;

— numru ta' ċelluli analizzati kull annimal;

— kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità;

— proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali;

— numru ta' eritroċiti immaturi mikronukleati, mogħtija separatament għal kull annimal;

— devjazzjoni standard medja ± ta' eritroċiti immaturi mikronukleati għal kull grupp;

— relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;

— analiżi statistiċi u metodi applikati;

— informazzjoni negattiva kurrenti u storika;

— informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin pożittiv.

— Diskussjoni dwar ir-riżultati.

— Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, pp. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, pp. 9-15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, Mutation Res. 123, pp. 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, pp. 29-80.

▼B

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: Developments in Science and Practice of Toxicology, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, Mutation Res., 189, pp. 103-112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, Fund. Appl. Toxicol. 14, pp. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, Mutation Res., 245, pp. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridime Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/-JEMMS, MMS, Mutation Res., 278, pp. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, 10, pp. 53-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchi-crotti, F., Romagna, F., Shimada, H. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *in vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, Mutation Res., 312, pp. 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, Mutagenesis, 10, pp. 313-319.

(13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.

(14) Hayashi, M., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Res., 120, pp. 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, Mutation Res., 120, pp. 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Res., 213, pp. 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Res., 347, pp. 97-99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part 1, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Staticical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.13/14. **MUTAĠENIĊITÀ -TEST TA' MUTAZZJONI RIVERSIVA TA' BATTERJI**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 471, Test ta' Mutazzjoni Riversiva ta' Batterji (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

It-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji juża aċidu amino li jeħtieġ kundizzjonijiet ta' *Salmonella typhimurium* u *Escherichia coli* biex jiġu żvelati mutazzjonijiet f'punti, li jinvolvu sostituzzjoni, żjieda jew tħassir ta' par wieħed jew aktar ta' bażijiet DNA (1) (2) (3). Il-prinċipju tat-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji huwa li jiskopri mutazzjonijiet li jirrivertu mutazzjonijiet preżenti fil-kundizzjonijiet tat-test u jirrestitwixxu l-kapaċità funzjonali tal-batterja biex tissintesizza aċidu amino essenzali. Il-batterji li jiġu lura jiġu skoperti mill-kapaċità tagħhom li jikbru fl-assenza ta' l-aċidu amino meħtieġ mill-kundizzjonijiet tal-ġenitur tat-test.

Mutazzjonijiet f'punti huma l-kawża ta' ħafna mard ġenetiku fil-bniedem u hemm xiehda sostanzjali li mutazzjonijiet f'punt f'onkoġeni u fil-ġeni ta' ċelluli somatiċi li jrażżnu t-tumuri huma involuti fil-formazzjoni ta' tumuri fil-bniedem u f'annimali ta' esperimenti. It-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji huwa rapidu, mhux għali u relattivament faċli biex jitwettaq. Ħafna mill-kundizzjonijiet tat-test għandhom diversi karatteristiċi li jagħmluhom aktar sensittivi għall-iskoperta ta' mutazzjonijiet inklużi sekwenzi DNA responsivi fis-siti ta' reversjoni, permeabilità miżjuda ta' Ċelloli għal molekuli kbar u l-eliminazzjoni ta' sistemi ta' riparazzjoni ta' DNA jew titjib ta' proċessi ta' riparazzjoni ta' DNA li huma suxxettibbli għall-iżbalji. L-ispeċifiċità tal-kundizzjonijiet tat-test jistgħu jipprovdu informazzjoni utli dwar it-tipi ta' mutazzjonijiet li huma kkaużati mill-aġenti ġenotossiċi. Bażi ta' informazzjoni kbira ħafna ta' riżultati għal varjetà wiesgħa ta' strutturi hija disponibbli għal testijiet ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji u ġew żviluppati metodoloġiji stabbiliti sew biex jittestjaw il-kimiċi b'karatteristiċi diversi fiżiko kimiċi, inklużi komposti li jiżvintaw.

Ara wkoll l-Introduzzjoni ġenerali Taqsima B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Test ta' mutazzjoni riversiva jew fi *Salmonella typhimurium* jew f'*Escherichia coli* jiżvela mutazzjoni f'amino aċidu li jeħtieġ karatteristika (histidine jew tryptophan, rispettivament) biex jipproduċi karatteristika indipendenti minn fornitura minn barra ta' aċidu amino.

Mutaġeni li jġibu s-sostituzzjoni ta' koppji ta' bażijiet huma aġenti li jikkawżaw bidla fil-bażi tad-DNA. F'test reversiv din il-bidla tista' tirrikorri fil-lok tal-mutazzjoni oriġinali, jew f'xi tieni lok fil-genome batteriku.

Mutaġeni li jġibu l-mutazzjoni tal-faża tal-qari huma aġenti li jikkawżaw iż-żieda jew ittħassir ta' pari ta' bażi waħda jew aktar fid-DNA, u b'hekk jibdlu l-faża tal-qari tar-RNA.

▼B

1.3. KONSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

It-test tal-mutazzjoni batterika reversiva jutilizza Ċelloli prokarijotiċi, li huma differenti minn Ċelloli tal-mammiferi fil-karatteristiċi bħal ma huma l-assorbiment, il-metaboliżmu, l-istruttura tal-kromożomi u l-proċessi ta' riparazzjoni tad-DNA. It-testijiet li jitwettqu *in vitro* ġeneralment jeħtieġu l-użu ta' għejun esoġenu għall-attivazzjoni metabolika. Sistemi ta' attivazzjoni metabolika *in vitro* ma jistgħux jissimulaw kompletament il-kundizzjonijiet *in vivo* fil-mammiferi. Għalhekk it-test ma jagħtix informazzjoni diretta fuq il-qawwa mutaġenika u karċinoġenika ta' sustanza fil-mammiferi.

It-test tal-mutazzjoni riversiva batterika normalment jintuża bħala l-ewwel pass għall-attività ġenolossika u, b'mod partikolari, għall-attività li toħloq mutazzjoni puntiformi. Informazzjoni estensiva wriet li ħafna kimiċi li huma posittivi f'dan it-test juru wkoll attività mutaġenika f'testijiet oħra. Hemm eżempji ta' aġenti mutaġeniċi li ma jiġux żvelati b'dan it-test; ir-raġunijiet għal dawn in-nuqqasijiet jistgħu jkunu attribwiti għan-natura speċifika tal-punt ta' laħħar żvelat, differenzi fl-attivazzjoni metabolika, jew differenzi fil-bijodisponibbilità. Minnaħa l-oħra, l-fatturi li jsaħħu s-sensitività tat-test tal-mutazzjoni riversiva batterika jistgħu jwasslu għal sopravalutazzjoni ta' l-attivita mutaġenika.

It-test tal-mutazzjoni riversiva batterika jista' ma jkunx xieraq għall-valutazzjoni ta' ċerti klassijiet ta' kimiċi, per eżempju komposti b'qawwa kbira batteriċida (eż. ċerti antibijotiċi) li dawk li huma maħsuba (jew huma magħrufa) li jiddisturbaw speċifikatament is-sitema ta' replika ta' Ċelloli fil-mammiferi (eż. inibituri tat-topojsomerasi u ċerti analogi nukleosidi). F'dawn il-każijiet jistgħu jkunu aktar xierqa testijiet fuq mutazzjoni fil-mammiferi.

Minkejja li ħafna mill-komposti li huma posittivi f'dan it-test huna karċinoġeni tal-mammiferi, il-korrelazzjoni mhijiex assoluta. Tiddependi fuq il-klassi tal-kimika u hemm karċinoġeni li ma jiġux żvelati b'dan it-test għax jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi oħra li mhumiex ġenotossiċi jew mekkaniżmi li ma jeżistux f'ċelluli batteriċi.

1.4. PRINĊIPJI TAL-METODU TAT-TEST

Is-sospensjonijiet taċ-Ċelloli batteriċi jiġu esposti għas-sustanza tat-test fil-presenza u fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġenea. Fil-metodu ta' inkorporazzjonmi fuq bażi, dawn is-sospensjonijiet jitħalltu ma' agar ta' kopertura u jitqiegħdu fuq il-bażi minnufih fuq medjum minimu. Fil-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni, it-taħlita tat-trattament tiġi inkubata u imbagħad imħallta ma' agar ta' kopertura qabel titqiegħed fuq bażi fuq medjum minimu. Għaż-żewġ metodi ta' teknika, wara jumejn ta' inkubazzjoni jew tlieta, jingħaddu l-kolonji revertanti u jiġu mqabbla man-numru ta' kolonji revertanti spontanji fuq il-bażijiet ta' kontroll tas-solvent.

Ġew deskritti ħafna proċeduri għat-twettiq tat-test tal-mutazzjoni riversiva batterika. Fost dawk li ġeneralment jintużaw hemm il-metodu ta' inkorporazzjoni fuq bażi (1) (2) (3) (4), il-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni (2) (3) (5) (6) (7) (8), il-metodu ta' fluttwazzjoni (9) (10), u l-metodu tas-sospensjoni (11). Ġew deskritti modifiki għall-ittestjar ta' gassijiet jew fwar (12).

▼B

Il-proċeduri deskritti fil-metodu jappartjenu primarjament għall-metodi ta' l-inkorporazzjoni fuq baži u ta' qabel l-inkubazzjoni. Kull wieħed minnhom huwa aċċettabbli biex isiru esperimenti kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha. Ċerti sustanzi jistgħu jiġu żvelati b'mod aktar effiċjenti meta jintuża l-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni. Dawn is-sustanzi jappartjenu għal klassijiet kimiċi li jinkludu nitrosamini alifatiċi short chain, metalli divalenti, aldejidi, komposti ta' koloranti ażo u dijażo, alkalojdi pirolliżidini, komposti allil u nitro komposti (3). Hu rikonoxxut ukoll li ċerti klassijiet ta' mutaġeni mhux dejjem jiġu żvelati meta jintużaw proċeduri standard bħal ma huma l-metodu ta' inkorporazzjoni fuq baži u l-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni. Dawn għandhom jitqiesu bħala "każijiet speċjali" hu huwa bil-qawwa rakkomandat li jintużaw proċeduri alternattivi biex jiġu żvelati. Il-"każijiet speċjali" li ġejjin jistgħu jiġu identifikati (flimkien ma' eżempji ta' proċeduri li jistgħu jintuiżaw biex jiġu żvelati): komposti ta' koloranti ażo u dijażo (3) (5) (6) (13), kimiċI ta' gass-sijiet u fwar (12) (14) (15) (16) u glikosidi (17) (18). Kull devjazzjoni mill-proċedura standard teħtieġ li tkun ġustifikata xjentifikament.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.5.1. **Preparazzjonijiet**

1.5.1.1. *Batterja*

Kulturi friski ta' batterja għandhom jitħallew jiżviluppaw sal-faži esponenzali tardiva jew il-faži bikrija stazzjonarja ta' l-Iżvilupp (madwar 109 Ċelloli kull ml). Ma għandhomx jintużaw kulturi fil-faži stazzjonarja tardiva. Huwa essenzali li l-kulturi li jintużaw fl-esperiment ikun fihom titolu għoli ta' batterja vijabbli. It-titolu jista' jintwera jew mill-informazzjoni storika ta' kontroll fuq il-fażijiet ta' żvilupp, jew minn kull analiži permezz tad-determinazzjoni ta' l-għadd ta' Ċelloli vijabbli bl-esperiment tal-baži.

It-temperatuta rakkomandata għall-inkubazzjoni hi ta' 37 ºĊ.

Għandhom jintużaw għallinqas ħames karatteristiċi ta' batterji. Dawn għandhom jinkludu erba' karatteristiċi ta' *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 jew TA97a jew TA97; TA98; u TA100) li ġew pruvati li huma ta' min wieħed jorbot fuqhom u responsivi għar-riproduzzjoni bejn laboratorji. Dawn l-erba' karatteristiċi *S. typhimurium* għandhom pari bażiċi GC fuq il-lok ta' reversjoni primarja u huwa magħruf li jistgħu ma jiżvelawx ċerti mutaġeni ossidanti, aġenti li jipprovokaw il-cross-linking u idrażini. Dawn is-sustanzi jistgħu jiġu żvelati bil-karatteristiċi ta' *E. coli* WP2 jew *S. typhimurium* TA102 (19) li jkollhom par ta' baži AT fil-lok primarju ta' reversjoni. Għalhekk it-tagħqid rakkomandat ta' karatteristiċi huwa:

— *S. typhimurium* TA1535, u

— *S. typhimurium* TA1537 jew TA97 jew TA97a, u

— *S. typhimurium* TA98, u

— *S. typhimurium* TA100, u

— *E. coli* WP2 uvrA, jew *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), jew *S. typhimurium* TA102.

Biex jiġu żvelati mutaġeni cross-linking jista' jkun preferibbli li wieħed jinkludi TA102 jew li tiżdied karatteristika ta' riparazzjoni tad-DNA ta' *E. coli* (eż. *E. coli* WP2 jew *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Għandhom jintużaw proċeduri stabbiliti għall-preparazzjoni ta' kulturi primarji, verifika ta' l-immarkar u l-ħażna. Għandha tintwera l-ħtieġa ta' l-amino aċidu għall-Iżvilupp għal kull kultura primarja ffriżata (istidina għal karatteristiċi ta' *S. typhimurium*, u triptofan għal karatteristiċi ta' *E. coli*). Karatteristiċi oħra fenotipiċi għandhom jiġu verifikati bl-istess mod, jiġifieri: il-presenza jew l-assenza ta' plasmidi tal-fattur R fejn ikun xieraq (jiġifieri r-resistenza għall-ampiċillina fil-karatteristiċi ta' TA98, TA100, u TA97a jew TA97, WP2 uvrA u WP2 uvrA (pKM101), u resistenza għall-ampiċillina + tetraċiklina fil-karatteristika TA 102); il-presenza ta' mutazzjonijiet karatteristiċi (jiġifieri mutazzjoni rfa mutation fi *S. typhimurium* permezz ta' senmsitività għal kristalvjola, u mutazzjoni uvrA fi *E. coli* jew mutazzjoni uvrB mutation fi *S. typhimurium*, permezz ta' sensitività għal dawl ultravjola) (2) (3). Il-karatteristiċi għandhom ukoll jipproduċu numru ta' bażijiet ta' kolonji revertanti spontanji fi ħdan il-meddiet ta' frekwenza mistennija mill-informazzjoni storika ta' kontroll tal-laboratorji u preferibbilment fil-medda msemmija fil-letteratura.

1.5.1.2. *Medjum*

Jintuża agar minimu xieraq (eż. li jkun fih medjum E minimu ta' Vogel-Bonner u glukożju), u agar ta' kopertura li jkun fih istidina u bijotin jew triptofan biex jippermetti ftit diviżjonijiet ta' Ċelloli (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Attivazzjoni metabolika*

Il-batterja għandha tiġi esposta għas-sustanza tat-test kemm fil-presenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika xierqa. Is-sistema li normalment l-aktar tintuża hija frazzjoni post mitokondrijali integrata ta' kofattur (S9) ippreparata mill-fwied ta' annimali gerriema trattata b'aġenti li jipprokuraw l-enżimi bħal ma huma l-Aroclor 1254 (1) (2) jew komposizzjoni ta' phenobarbitone u β-naphthoflavone (18) (20) (21). Il-frazzjoni post mitokondrijali normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet fil-medda minn 5 sa 30 % v/v fit-taħlita S9. L-għażla u l-kundizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika tista' tiddependi fuq il-klassi tal-kimika li tintuża. F'ċerti każijiet, jista' jkun xieraq li jintużaw aktar minn konċentrazzjoni waħda ta' frazzjon post mitokondrijali. Għal komposti ta' koloranti ażo u dijażo, jista' jkun aktar xieraq li tintuża sistema ta' attivazzjoni metabolika (6) (13).

1.5.1.4. *Sustanza/preparazzjoni tat-test*

Sustanzi solidi tat-test għandhom jiddewbu jew jiġu sospiżi f'solventi jew mezzi xierqa u dilwiti kif ikun xieraq qabel ma tiġi ttrattata l-batterja. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistemi tat-test u/jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda sakemm l-informazzjoni ta' l-istabbilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Ma għandhux jkun hemm suspett ta' reazzjoni kimika tas-solvent/-mezz mas-sustanza tat-test u dan is-solvent/mezz għandu jkun kompatibbli mas-sopravvivenza tal-batterja u ma' l-attività S9 (22). Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompattibilità tagħhom. Huwa rakkomandat li kull fejn ikun possibbli għandu l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż. Meta jiġu ttestjati sustanzi li mhumiex stabbli fl-ilma, is-solventi organiċi li jintużaw ma għandux ikollhom ilma.

▼B

1.5.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.5.2.1. *Karatteristiċi tat-test (Ara 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni*

Fost il-kriterji li għandhom jitqiesu meta jiġi determinat l-ogħla ammont tas-sustanza tat-test li għandha tintuża hemm il-ċitotossiċità u s-solubbilità fit-taħlita ta' trattament finali.

Jista' jkun utli li jiġu stabbiliti t-tossiċità u l-insolubbilità f'esperiment preliminari. Iċ-ċitossiċità tista' tiġi żvelata b'riduzzjoni fl-għadd ta' konolonji revertanti, bid-dehra ta' żvilupp a normali tal-fond, jew bil-grad ta' sopravivenza tal-kulturi ttratati. Iċ-ċitossiċità ta' sustanza tista' tinbidel fil-preżenza ta' sistemi ta' attivazzjoni metabolika. L-insolubbilità għandha tiġi stmata bħala preċipitazzjoni fit-taħlita finali taħt il-kundizzjonijiet attwali tat-test u tkun evidenti għall-għajn mingħajr għanjuna.

Il-konċentrazzjoni massima rakkomandata għat-test għal sustanzi solubbli li mhumiex ċitotossiċi hija 5mg/bażi jew 5µl/bażi. Għal sustanzi li mhumiex ċitotossiċi u li ma jinħallux fuq 5mg/bażi jew 5 µl/bażi u waħda mill-konċentrazzjonijiet ittestjati jew aktar għandha tkun mhux solubbli fit-taħlita finali tat-trattament. Sustanzi tat-test li huma diġà ċitotossiċi taħt il-5mg/bażi jew 5 µl/bażi għandhom jiġu ttestjati sa konċentrazzjoni ċitotossika. Dak li jippreċipita ma għandux jiddisturba l-għadd.

Għandhom jintużaw għallinqas ħames konċentrazzjonijiet differenti analizzabbli tas-sustanza tat-test b'madwar intervalli ta' semi logarittmi (jiġifieri √10) bejn punti tat-test għal esperiment inizjali. Jistgħu ikunu xierqa intervalli iqsar meta jkun qed jiġi investigat rispons ta' konċentrazzjoni. Testjar għola mill-ċonċentrazzjoni ta' 5mg/bażi jew 5 µl/bażi jista' jiġi kkunsidrat meta ssir il-valutazzjoni ta' sustanzi li jkollhom ammonti sostanzjali ta' impuritajiet potenzalment mutaġeniċi.

1.5.2.3. *Kontrolli negattivi u pożittivi*

Kontrolli (solvent jew mezz) pożittivi u negattivi konkurrenti speċifiċi għall-kwalitajiet, kemm b'attivazzjoni metabolika jew mingħajr, għandhom jiġu inklużi f'kull eżami. Għandhom jintgħażlu konċentrazzjonijiet ta' kontrolli pożittivi li juru l-prestazzjoni effettiva ta' kull eżami.

Għal eżamijiet li jagħmlu użu minn sistema ta' attivazzjoni metabolika, is-sustanza (i) ta' referenza ta' kontoll pożittiv għandha(hom) tingħażel fuq bażi tat-tip tal-kwalitajiet ta' batterja użati.

Is-sustanzi li ġejjin huma eżemmpji ta' kontrolli pożittivi xierqa għal eżamijiet ta' attivazzjoni metabolika:

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
781-43-1	212-308-4	9,10- Dimetil-antraċena
57-97-6	200-359-5	7,12- Dimetilbenż(*a*)antraċena
50-32-8	200-028-5	Benzo(a)pirena
613-13-8	210-330-9	2-Amino-antraċena

▼B

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
50-18-0		Ċiklofosfamida
6055-19-2	200-015-4	Monoidrat taċ-ċiklofosfamida

Is-sustanza li ġejja hija kontroll pożittiv xieraq għall-metodu ta' attivazzjoni metabolika riduttiva:

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
573-58-0	209-358-4	Congo Red

It-2-Aminoantraċena ma għandhiex tintuża bħala l-uniku indikatur ta' l-effikaċja tat-taħlita S9. Jekk tintuża t-2-aminoantraċena, kull lott ta' S9 għandu jkun karatteriżat b'mutaġen li jeħtieġ l-attivazzjoni metabolika b'enżimi mikrosomali, eż. benzo(a)pirena, dimetilbenzantraċena.

Is-sustanzi li ġejjin huma eżempji ta' kontrolli pożittivi skond karatteristiċi speċifiċi għal eżamijiet imwettqa mingħajr is-sistema ta' attivazzjoni metabolika essoġena:

NRI CAS	NRI EINECS	ISMIJIET	Strain
26628-22-8	247-852-1	Ażidu tas-sodju	TA 1535 u TA 100
607-57-8	210-138-5	2 Mikro-fluworena	TA 98
90-45-9	201-995-6	9 Amino-akridina	TA 1537, TA 97 u TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 u TA 97a
80-15-9	201-254-7	Iperossidu tal-Kumena	TA 102
50-07-7	200-008-6	Mitomycin C	WP2 uvrA u TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-3-nitro-N-nitro-sogwanidina	WP2, WP2uvrA u WP2uvrA (pK M101)
56-57-5	200-281-1	4-Nitrokwinolina-1-ossidu	WP2, WP2uvrA u WP2uvrA(pK M101)
3688-53-7		Furilfuramida (AF2)	Karatteristiċi li fihom il-plasmid

Jistgħu jintużaw sustanzi ta' referenza ta' kontroll pożittiv xierqa oħra. Għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontroll pożittiv li huma relatati ma' klassijiet ta' kimiċi, meta dan ikun possibbli.

Għandhom jiġu inklużi kontrolli negattivi, li jikkonsistu biss f'solvent jew mezz, mingħajr sustanza tat-test, u mod ieħor ittrattati bl-istess mod bħal gruppi ta' trattament. B'żieda ma dan, għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakamm ma jkunx hemm informazzjoni storika ta' kontroll li turi li s-solvent magħżul ma jġibx effetti ta' ħsara jew mutaġeniċi.

▼B

1.5.3. **Proċedura**

Għall-metodu ta' inkorporazzjoni fuq bażi (1) (2) (3) (4), mingħajr l-attivazzjoni metabolika, normalment 0,05 jew 0,1 ml tas-soluzzjonijiet tat-test, 0,1 ml ta' kulturi friski ta' batterja (li jkun fihom madwar 108 ċelloli vijabbli u 0,5 ml ta' tarka sterili jitħalltu ma' 2,0 ml ta' agar ta' kopertura. Għall-eżami bl-attivazzjoni metabolika, normalment 0,5 ml tat-taħlita ta' l-attivazzjoni metabolika li jkun fiha ammont adegwat ta' frazzjoni post mitokondrijali (fil-medda ta' 5 sa 30 % v/v fit-taħlita ta' l-attivazzjoni metabolika) jitħalltu ma' agar ta' kopertura (2,0 ml) flimkien mal-batterja u mas-sustanza tat-test/soluzzjoni tat-test. Il-kontenut ta' kull tubu jiġi mħallat u jitferra fuq superfiċi ta' bażi b'agar minimu. L-agar ta' kopertura jitħalla jsir solidu qabel l-inkubazzjoni.

Għall-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni (2) (3) (5) (6), is-sutanza tat-test/soluzzjoni tat-test tiġi inkubata minn qabel mal-karatteristika tat-test (li jkun fiha madwar 108 Ċelloli vijabbli u t-tarka sterili jew is-sistema ta' attivazzjoni metabolika, 0,5ml) ġeneralment għal 20 minuta jew aktar f'temperatura ta' 30- 37Ċ qabel ma titħallat ma' l-agar ta' kopertura u titferra fuq superfiċi ta' bażi ta' agar minimu. Ġeneralment 0,05 jew 0,1 ml tas-sustanza tat-test/soluzzjoni tat-test, 0,1 ml ta' batterja u 0,5ml ta' taħlita S9 jew tarka sterili jitħalltu ma' 2,0 ml ta' agar ta' kopertura. It-tubi għandhom jitħallew li tidħol l-arja fihom fl-istadju ta' qabel l-inkubazzjoni billi jintuża aġitatur.

Biex issir stima xierqa tal-varjazzjoni, għandhom jintużaw tarki ittriplikati għal kull livell ta' doża. L-użu ta' tarka duplikata hija aċċettabbli meta xjentement ġustifikata. It-telfa ta' kull tant ta' bażi ma tinvalidax it-test neċessarjament.

Sustanzi gassużi jew volatili għandhom jiġu ttestjati b'metodi xierqa, bħalma huma mezzi magħluqa (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubazzjoni**

Il-bażijiet kollha f'eżami partikolari għandhom jiġu inkubati ta' 37 °C għal 48-72 siegħa. Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni, għandu jingħadd in-numru ta' kolonji revertanti kull bażi.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Informazzjoni għandha tiġi preżentata bħala numru ta' kolonji revertanti kull bażi. Għandu jingħata wkoll in-numru ta' kolonji revertanti kemm dwar bażijiet ta' kontroll negattivi (kontroll tas-solvent, u kontroll mhux trattat, jekk ikun ġie użat) kif ukoll bażijiet ta' kontroll pożittivi. L-għadd ta' bażijiet individwali, in-numru medju ta' kolonji revertanti kull bażi u d-devjazzjoni standard għandhom jiġu preżentati għas-sustanza tat-test u għall-kontrolli pożittivi u negattivi (mhux trattati u/jew tas-solvent).

Ma hemmx ħtieġa ta' verifika għal rispons pożittiv ċar. Riżultati ambigwi għandhom jiġu ċċarati b'permezz ta' aktar testijiet preferibbilment billi jkun hemm modifika fil-kundizzjonijiet ta' l-esperiment. Riżultati negattivi għandhom jiġu konfermati fuq il-bażi ta' każ b'każ. F'dawk il-każijiet fejn il-konferma ta' riżultati negattivi mhiex ikkunsidrata bħala negattiva, trid tingħata ġustifikazzjoni. Modifikazzjonijiet ta' parametri ta' studju sabiex tiġi estiża l-medda tal-kundizzjonijiet stmati għandha tiġi kkonsidrata f'esperimenti ta' wara. Parametri ta' studju li jisgħu jiġu modifikati jinkludu l-ispazjar tal-konċentrazzjoni, il-metodu ta' trattament (inkorporazzjoni mal-bażi jew qabel l-inkubazzjoni fil-likwidu), u kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika.

▼B

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TA' RIŻULTATI

Hemm diversi kriterji sabiex jiġi determinat riżultat pożittiv, bħal żieda ta' relata mal-konċentrazzjoni matul il-medda ttestjata u/jew żieda riproduċibbli f'konċentrazzjoni waħda jew aktar fin-numru ta' kolonji revertanti kull baži f'mill-inqas karatteristika waħda b'sistema ta' attivazzjoni metabolika jew mingħajrha (23). Għandha tiġi kunsidrata l-ewwel ir-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Jistgħu jintużaw metodi ta' statistika bħala għanjuna għal valutazzjoni tar-riżultati tat-test (24). Madankollu, is-sinjifikanza statistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal rispons pożittiv.

Sustanza ta' test li dwarha r-riżultati ma josservawx il-kriterji fuq imsemmija hija kkunsidrata bħala mhux mutaġenika f'dan it-test.

Minkejja li ħafna esperimenti jagħtu riżultati ċari, pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni mogħtija ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività tas-sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ambigwi jew dubbjuži rrispettivament min-numru ta' drabi li jiġi ripetut l-esperiment.

Riżultati pożittivi mit-test ta' mutazzjoni reversibbli batterika jindikaw li s-sustanza tiġġenera mutazzjonijiet mal-punt permezz ta' sostituzzjonijiet fuq il-baži jew tibdiliet fil-parametri tal-ġenomu ta' jew *Salmonella typhimurium* u/jew *Escherichia coli*. Riżultati negattivi jindikaw li taħt il-kundizzjonijiet tat-test is-sustanza tat-test mhix mutaġenika fl-ispeċi ttestjati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/mezz;

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Karatteristiċi:

— Karatteristiċi użati;

— numru ta' ċelluli kull kultura;

— dettalji tal-karatteristiċi.

Kundizzjonijiet tat-Test:

— ammont tas-sustanza tat-test kull baži (mg/baži jew µl/baži) flimkien mar-raġuni bażija għall-għażla tad-doża u n-numru ta' bażijiet kull konċentrazzjoni;

— medja użata;

— tip u komposizzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika, inkluži l-kriterji ta' aċċettazzjoni;

— proċeduri tat-trattament.

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità;

— sinjali ta' preċipitazzjoni;

— għadd ta' bażijiet individwali;

▼B

— in-numru medju ta' kolonji rivertanti kull baži u devjazzjoni standard;

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;

— analiżi statistiċi, jekk ikun hemm;

— informazzjoni dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, fl-istess ħin, bil-meded, mezzi, u devjazzjonjiet standard;

— informazzjoni dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, storiċi, bil-meded, mezzi, u devjazzjonjiet standard.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters 1, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. Food Safety, 8, pp. 167-177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutation Res., 38, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335-344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen., 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/-Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, Cancer Res., 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/-Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼B

B.15. **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-ċiklo-hessimida.

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.

▼B

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.

Kundizzjonijiet 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, pożittivi, li m'humiex trattati għandhom isiru fl-istess ħin. Kimiċi xierqa għall-kontroll pożittiv 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.

Kundizzjonijiet 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.

▼B

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 Ċelloli wieqfin jew li qed jikbru. Esperimenti inizjali għandhom isiru fuq Ċelloli li qed jikbru: 1-5 x 10 Ċelloli/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-Ċelloli 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' Ċelloli 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-kundizzjonijiet tat-test: Ċelloli f'fażi wieqfa jew Ċelloli li qed jikbru, komposizzjoniiet tal-mezzi, it-temperatura u t-tul ta' l-inkubazzjoni, is-sistema għall-attivazzjoni metabolika;

— il-kundizzjonijiet 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.

▼B

B.16. **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-Ċelloli 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.

▼B

Kundizzjonijiet 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 hemm 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-Ċelloli 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.

Kundizzjonijiet 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'refriġe-rejter (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' rikombi-nazzjonijiet mitotiċi spontanji ġewwa l-medda normali aċċettata.

▼B

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 Ċelloli wieqfin jew li qed jikbru. Esperimenti inizjali għandhom isiru fuq Ċelloli li qed jikbru: 1-5 × 10^7 Ċelloli/ml huma esposti għall-kimika tat-test għal perjodu ta' ħin sa 18-il siegħa f'temperatura ta' 28-37 ºC 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' Ċelloli fil-faża 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-kundizzjonijiet tat-test: Ċelloli f'faża wieqfa jew Ċelloli li qed jikbru, komposizzjoni tal-mezzi, it-temperatura u t-tul ta' l-inkubazzjoni, is-sistema għall-attivazzjoni metabolika;

— il-kundizzjonijiet 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.

▼B

3.2. IL-VALUTAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzjoni Ġenerali Parti B.

▼B

B.17. **MUTAĠENEĊITÀ –TEST TAL-MUTAZZJONI TAL-ĠENETAĊ-ĊELLULA TAL-MAMMIFERI *IN VITRO***

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika tal-OECD TG 476, Test tal-Mutazzjoni tal-Ġene taċ-Ċellula tal-Mammiferi *In vitro* (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

It-test tal-mutazzjoni tal-ġene taċ-ċellula tal-mammiferi *in vitro* jista' jintuża biex jiġu żvelati mutazzjonijiet tal-ġene miġjuba minn sustanzi kimiċi. Il-linji ta' Ċelloli xierqa jinkludu L5178Y Ċelloli mouse lymphoma, il-linji CHO, CHO-AS52 u V79 ta' ċelluli ta' Chinese hamster, u ċ-Ċelloli umani lymphoblastoid TK6 (1). F'dawn il-linji ta' Ċelloli l-punti tat-truf ġenetiċi li l-aktar jintużaw ikejlu l-mutazzjoni fi thymidine kinase (TK) u hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), u transġene ta' xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (XPRT). It-testijiet ta' mutazzjoni TK, HPRT u XPRT jiżvelaw dehriet differenti ta' ġrajjiet ġenetiċi. Il-lok awtosomali ta' l-TK u l-XPRT jista' jippermetti l-iżvelar ta' ċerti ġrajjiet ġenetiċi (eż. ħafna tħassir) li mhumiex żvelati fil-locus HPRT locus fuq kromożomi X (2)(3)(4)(5)(6).

Fit-test tal-mutazzjoni tal-ġene taċ-ċellula tal-mammiferi *in vitro*, jistgħu jintużaw kulturi ta' linji ta' Ċelloli jew karatteristiċi ta' Ċelloli. Iċ-Ċelloli li jintużaw jingħażlu fuq il-bażi tal-kapaċità tagħhom li jiżviluppaw f'kultura u l-istabbilità fil-frekwenza ta' mutazzjoni spontanea.

Ġeneralment it-testijiet imwettqa *in vitro* jeħtieġu l-użu ta' għejun esoġeneu ta' attivazzjoni metabolika. Din is-sistema ta' attivazzjoni metabolika ma tista'x tikkopja kompletament il-kundizzjonijiet *in vivo* fil-mammiferi. Wieħed għandu jevita kundizzjonijiet li jistgħu jwasslu għal riżultati li ma jirriflettux mutaġeneċità intrinsika. Jista' jkun hemm riżultati posittivi li ma jirriflettux mutaġeneċità intrinsika minn bidliet fil-pH, osmolalità jew livelli għolja ta' ċitotossiċità (7).

Dan it-test jintuża biex tiġi individwata l-possibbiltà ta' mutaġeni u karċinoġeni fil-mammiferi. Ħafna komposti li huma posittivi f'dan it-test huma karċinoġeni fil-mammiferi; madankollu, m'hemmx korrelazzjoni perfetta bejn dan it-test u l-karċinoġeniċità. Il-korrelazzjoni tiddependi fuq il-klassi kimika u hemm evidenza dejjem tiżdied li ježistu karċinoġeni li ma jiġux żvelati b'dan it-test għax jidhru li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi oħra mhux ġenotossiċi jew mekkaniżmi li ma ježistux f'Ċelloli batteriċi (6).

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali Taqsima B:

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Mutazzjoni 'l quddiem: mutazzjoni tal-ġene mit-tip parental ital-forma mutanti li toħloq alterazzjoni jew telf ta' l-attività enżimatika tal-funzjoni tal-proteina kodifikata.

Mutaġeni li jġibu s-sostituzzjoni tal-koppji tal-bażi: sustanzi li jikkawżaw is-sostituzzjoni ta' koppji tal-bażi waħda jew aktar fid-DNA.

Mutaġeni li jġibu l-mutazzjoni tal-faża tal-qari: sustanzi li jikkawżaw iż-żieda jew ittħassir ta' pari ta' bażi waħda jew multipli fil-molekula tad-DNA.

▼B

Hin ta' espressjoni fenotipika: perjodu li fih prodotti ta' ġene mhux mibdula jitneħħew mill-għadd ta' Ċelloli vijabbli.

Frekwenza mutanti: l-għadd ta' Ċelloli mutanti osservati diviżi bl-għadd ta' Ċelloli vijabbli.

Żvilupp totali relattiv: żieda fl-għadd taċ-Ċelloli tul iż-żmien komparata ma' popolazzjoni ta' Ċelloli ta' kontroll; kalkolat bħala l-prodott ta' l-iżvilupp tas-sospensjoni relattiv għaż-żminijiet ta' kontroll negattiv għall-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva għall-kontroll negattiv.

Żvilupp tas-sospensjoni relattiv: żieda fl-għadd taċ-Ċelloli tul il-perjodu ta' espressjoni relattiv għall-kontroll negattiv.

Vijabilità: l-effiċjenza tal-klonazzjoni taċ-ċelluli trattati fil-ħin ta' meta jitqiegħdu fuq bażi f'kundizzjonijiet selettivi wara l-perjodu ta' espressjoni.

Sopravivenza: l-effiċjenza tal-klonazzjoni taċ-Ċelloli trattati meta jitqiegħdu fuq bażi wara li jintemm il-perjodu ta' trattament; ġeneralment is-sopravivenza hija espresso paragunata mas-sopravivenza tal-popolazzjoni taċ-Ċelloli ta' kontroll.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Iċ-Ċelloli li għandhom nuqqas ta' thymidine kinase (TK) minħabba fil-mutazzjoni TK+/- > TK-/- huma reżistenti għall-effetti ċitotossiċi tal-pyrimidine analogue trifluorothymidine (TFT). Iċ-ċelluli profiċenti tat-Thymidine kinase huma sensittivi għat-TFT, li joħloq l-inibizzjoni tal-metaboliżmu ċellulari u jwaqqaf aktar diviżjoni fiċ-Ċelloli. B'hekk Ċelloli mutanti jistgħu jipproliferaw fil-presenza tat-TFT, waqt li Ċelloli normali, li jkun fihom it-thymidine kinase, ma jistgħux. Bl-istess mod, Ċelloli li għandhom nuqqas ta' HPRT jew XPRT jingħażlu skond ir-reżistenza għal 6-thioguanine (TG) jew 8-azaguanine (AG). Il-karatteristiċi tas-sustanza tat-test għandhom jiġu meqjusa sew jekk jiġi ttestjat analogu tal-bażi jew compost relatat ma' l-aġent selettiv f'xi wieħed mit-testijiet tal-mutazzjoni tal-ġene taċ-ċellula fil-mammiferi. Bħala eżempju, għandha tiġi investigata kull tossiċità selettiva suspettata bis-sustanza tat-test għal ċelluli mutanti u mhux mutanti. Għalhekk, il-prestazzjoni tas-sistema/aġent tas-selezzjoni għandha tiġi konfermata meta jiġu ttestjati kimiċi li huma strutturalment relatati ma' l-aġent selettiv (8).

Iċ-Ċelloli f'sospensjoni jew kultura monostrata huma esposti għas-sustanza tat-test, kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha, għal perjodu ta' żmien xieraq u subkulturati biex jippermettu l-espressjoni fenotipika qwabel is-selezzjoni mutanti (9) (10) (11) (12) (13). Normalment iċ-ċitossiċità tiġi stabbilita billi titkejjel l-effiċjenza ta' klonazzjoni relattiva (sopravivenza) jew l-iżvilupp totali relattiv tal-kulturi wara l-perjodu ta' trattament. Il-kulturi ttrattati jinżammu f'medjum ta' żvilupp għal perjodu ta' żmien suffiċjenti, karatteristiku ta' kull locus magħżul u tip ta' ċellula, biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutazzjonijiet magħmula. Il-frekwenza mutanti tiġi stabbilita bl-inseminazzjoni ta; għadd magħruf ta' Ċelloli f'medjum li jkun fih l-aġent selettiv biex jiġu żvelati Ċelloli mutanti u f'medjum mingħajr aġent selettiv biex tiġi żvelata l-effiċjenza tal-klonazzjoni (vijabilità). Wara perjodu xieraq ta' inkubazzjoni, jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza mutanti hi derivate mill-għadd ta' kolonji mutanti f'medjum selettiv u l-għadd ta' kolonji f'medjum mhux selettiv.

▼B

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Ċelloli*

Hemm varjetà ta' Ċelloli disponibbli għall-użu għal dan it-test inklużi subkloni ta' Ċelloli ta' L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 jew TK6. It-tipi ta' Ċelloli użati f'dan it-test għandhom ikunu ddimostraw sensitività għal mutaġeni kimiċi, effiċjenza għolja ta' klonazzjoni u frekwenza mutanti spontanea stabbli. Iċ-Ċelloli għandhom jiġu kontrollati għal kontaminazzjoni mill-mikoplasma u m'għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati.

It-test għandu jkun iddisinjat biex ikollu sensitività u qawwa predeterminata. L-għadd ta' ċelluli, kulturi u konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test użati għandhom jirriflettu dawn il-parametri definiti (14). L-għadd minimu ta' Ċelloli vijabbli li jinqgħu ħajjin wara it-trattament u li jintużaw f'kull stadju tat-test għandu jkun msejjes fuq il-frekwenza tal-mutazzjoni spontanea. Gwida ġenerali hija li jintuża għadd ta' Ċelloli li hu għall-inqas 10 darbiet l-invers tal-frekwenza tal-mutazzjoni spontanea. Madankollu, huwa rakkomandat li jiġu utilizzati għall-inqas 106 Ċelloli. Informazzjoni storika xierqa dwar is-sistema taċ-ċellula użata għandha tkun disponibbli biex tindika l-prestazzjoni konsistenti tat-test.

1.4.1.2. *Postijiet u kundizzjonijiet tal-kulturi*

Għandhom jintużaw postijiet tal-kulturi xierqa, u kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni (kontenituri tal-kulturi, temperatura, konċentrazzjoni ta' CO_2 u umdità). Il-postijiet għandhom jingħażlu skond is-sistemi selettivi u t-tip ta' ċellula użati f'dan it-test. Huwa partikolarment importanti li l-kundizzjonijiet tal-kulturi jingħażlu hekk li jiżguraw l-iżvilupp ottimali taċ-Ċelloli waqt il-perjodu ta' espressjoni u l-kapaċità tal-formazzjoni ta' kolonji ta' kemm iċ-ċelluli mutanti kif ukoll dawk mhux mutanti.

1.4.1.3. *Preparazzjoni tal-kulturi*

Iċ-Ċelloli huma propagati minn ħażniet ta' kulturi, inseminati f'medjum ta' kultura u inkubati f'temperatura ta' 37 ºC. Qabel ma jintużaw f'dan it-test, il-kulturi għandhom jitnaddfu minn Ċelloli mutanti pre-eżistenti.

1.4.1.4. *Attivazzjoni metabolika*

Iċ-ċelluli għandhom jiġu esposti għas-sustanza tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika xierqa. Is-sistema l-aktar użata hija frazzjoni post mitokondrijali supplimentata b'kofattur (S9) preparata mill-fwied ta' annimali gerriema trattat b'aġenti li jġibu l-enżimi bħal ma huma l-Aroklor 1254 (15) (16) (17) (18) jew taħlita ta' phenobarbitone u β-naphthoflavone (19) (20).

Normalment il-frazzjon post mitokondrijali tintuża f'konċentrazzjonijiet fil-medda minn 1-10 % v/v fil-medjum finali tat-test. L-għażla u l-kundizzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika tista' tiddependi fuq il-klassi tal-kimika li tkun qed tiġi ttestjata. F'ċerti każijiet jista' jkun xieraq li tiġi utilizzata iktar minn konċentrazzjoni waħda tal-frazzjon post mitokondrijali.

▼B

Numru ta' żviluppi, inkluża l-kostruzzjoni ta' linji ta' Ċelloli ta' inġinerija ġenetika li jesprimu enżimi ta' attivazzjoni speċifika, jistgħu jipprovdu l-potenzal għall-attivazzjoni endoġenea. L-għażla tal-linji taċ-Ċelloli użati għandha tkun ġustifikata xjentifikament (eż. bir-rilevanza ta' l-isoenżim ċitokromu P450 għall-metaboliżmu tas-sustanza tat-test).

1.4.1.5. *Preparazzjoni tas-sustanza tat-test*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewba jew sospiżi f'solventi jew mezzi xierqa u dilwiti jekk ikun xieraq qabel it-trattament taċ-Ċelloli. Sustanzi tat-test likwidi jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistemi tat-test u/jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda tas-sustanza tat-test sakemm l-informazzjoni dwar l-istabbilità ma turix l-aċċettabbilità tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Ma għandux jkun hemm suspett ta' reazzjoni kimika tas-solvent/-mezz mas-sustanza tat-test u s-solvent/mezz għandu jkun kompatibbli mas-sopravivenza taċ-Ċelloli u l-attività S9. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Huwa rakkomandat li kull fejn ikun possibbli l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż. Meta jiġu testjati sustanzi li mhumiex stabbli fl-ilma, is-solventi organiċi li jintużaw ma għandhux ikollhom ilma. L-ilma jista' jitneħħa billi jiżdied passatur molekulari.

1.4.2.2. *Konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni*

Fost il-kriterji li għandhom jitqiesu biex tiġi stabbilita l-ogħla konċentrazzjoni hemm iċ-ċitossiċità, is-solubbilità fis-sistema tat-test u bidliet fil-pH jew osmolalità.

Iċ-ċitossiċita għandha tiġi stabbilita bl-attività metabolika jew mingħajrha fl-esperiment prinċipali bl-użu ta' indikazzjoni xierqa ta' integrità u żvilupp taċ-Ċelloli, bħal ma huma l-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva (sopravivenza) jew l-iżvilupp totali relattiv. Jista' jkun utli li jiġu determinati ċ-ċitossiċità u s-solubbilità f'esperiment preliminari.

Għandhom jintużaw għall-inqas erba' konċentrazzjonijiet analizzabbli. Fejn ikun hemm iċ-ċitossiċità, dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom ikopru medda mill-massimu għal fuq iċ-ċitossiċità allura għandha tirriżulta f'madwar 10-20 % (iżda mhux inqas minn 10 %) sopravivenza relattiva (effiċjenza ta' klonazzjoni relattiva) jew żvilupp totali relattiv. Għal sustanzi relattivament mhux tossiċi, il-konċentrazzjoni massima tat-test għandha tkun 5 mg/ml, 5 µl/ml, jew 1,01 M, liema minnhom ikun l-anqas.

▼B

Sustanzi relattivament mhux solubbli għandhom jiġu ttestjati sa jew lil hinn mil-limitu tagħhom ta' solubilità taħt kundizzjonijiet ta' kulturi. Il-prova tas-solubbilità għandha tiġi stabbilita fil-medjum tat-trattament finali li għalih huma esposti ċ-Ċelloli. Jista' jkun utli li tiġi valutata s-solubilità fil-bidu u fl-aħħar tat-trattament, għax is-solubilità tista' tinbidel waqt il-kors ta' l-espożizzjoni fis-sistema tat-test minħabba fil-preżenza ta' Ċelloli, S9, serum eċċ. L-insolublità tista' tiġi żvelata mingħajr għajnuna lill-għajn. Il-preċipitat m'għandux jostakola l-għadd.

1.4.2.3. *Kontrolli*

Għandhom jiġu inklużi f'kull esperiment kontrolli posittivi u negattivi fl-istess ħin (solvent jew mezz), kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha. Meta tintuża l-attivazzjoni metabolika, il-kimika ta' kontroll posittiva għandha tkun dik li-teħtieġ li l-attivazzjoni tagħti rispons mutaġeniku.

Eżempji ta' sustanzi ta' kontroll posittiv jinkludu:

Kondizzjoni ta' attivazzjoni metabolika	Post	Sustanza	Nru CAS	Nru EINECS
Assenza ta' attivazzjoni metabolika essoġenea	HPRT	Metansulfonat ta' l-etil	62-50-0	200-536-7
		Ethyl nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (kolonji żgħar u kbar)	Methyl methanesulphonate	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Etil methanesulphonate	62-50-0	200-536-7
		Nitrosourea ta' l-etil	759-73-9	212-072-2
Preżenza ta' attivazzjoni metabolika essoġenea	HPRT	3-Methylcholanthrene	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimethylbenzanthracen e	57-97-6	200-359-5
	TK (kolonji żgħar u kbar)	Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
		Cyclophosphamide monohydrate	6055-19-2	
		Benżo(a)pirena	50-32-8	200-028-5
		3-Metilkolantrena	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimethylamine (għal livelli għoljin ta' S-9)	62-75-9	200-549-8
		Benżo(*a*)pirena	50-32-8	200-028-5

Jistgħu jintużaw sustanzi ta' referenza ta' kontroll posittiv oħra xierqa, eż. jekk laboratorju jkollu bażi ta' informazzjoni storika fuq 5-bromo 2'-deoxyuridine (Nru CAS 59-14-3, Nru EINECS 200-415-9), tista' tintuża ukoll din is-sustanza ta' referenza. Meta jkunu disponibbli, għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontroll posittiv relatat ma' klassi ta' kimika.

▼B

Għandhom jiġu inklużi kontrolli negattivi, li jikkonsistu biss f'solvent jew mezz fil-medjum ta' trattament, u trattati bl-istess mod bħall-gruppi ta' trattament. B'żieda ma' dan għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakemm l-informazzjoni storika ta' kontroll turi li ma jkunx hemm effetti dannużi jew mutaġeniċi kkaużati mis-solvent magħżul.

1.4.3. **Proċedura**

1.4.3.1. *Trattament bis-sustanza tat-test*

Iċ-Ċelloli li jipproliferaw għandhom jiġu esposti għas-sustanza tat-test kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha. L-espożizzjoni għandha tkun għal perjodu xieraq ta' żmien (normalment 3-6 siegħat hu effettiv). Il-ħin ta' l-espożizzjoni jista' jittawwal fuq ċiklu ta' Ċelloli wieħed jew aktar.

Jistgħu jintużaw kulturi ttrattati duplikati jew singoli ma' kull konċentrazzjoni ttestjata. Meta jintużaw kulturi singoli, l-għadd ta' konċentrazzjonijiet għandu jiżdied biex jiġi żgurat li jkun hemm numru adegwat ta' kulturi għall-analiżi (eż. għall-inqas tmien konċentrazzjonijiet analizzabbli). Għandhom jintużaw kulturi ta' kontroll negattivi duplikati (solvent).

Sustanzi gassużi jew volatili għandhom jiġu ttestjati b'metodi xierqa, bħal ma huma f'kontenituri magħluqa ta' kulturi (21) (22).

1.4.3.2. *Tkejjil ta' sopravivanza, vijabbilità u frekwenza tal-mutazzjonijiet*

Fl-aħħar tal-perjodu ta' espożizzjoni, iċ-ċelluli jinħaslu u jitqiegħdu f'kulturi biex tiġi determinata s-sopravivenza u biex jippermettu l-espressjoni tal-fenotip mutanti. It-tkejjil taċ-ċitossiċità billi tiġi determinata l-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva (sopravivenza) jew l-iżvilupp totali relattiv tal-kulturi normalment jinbeda wara l-perjodu ta' trattament.

Kull locus għandu ħtieġa ta' żmien minimu definit biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutanti ġodda li jkunu nħolqu (HPRT u XPRT jeħtieġu għall-inqas 6-8 ijiem, u TK għall-inqas jumejn). Iċ-Ċelloli jitkabbru f'medjum b'aġent(i) selettiv(i) jew mingħajru(hom) għad-determinazzjoni ta' l-għadd ta' mutanti u l-effiċjenza tal-klonazzjoni, rispettivament. It-tkejjil tal-vijabilità (li jintuża biex tiġi kalkolata l-frekenza tal-mutazzjonijiet) jinbeda fl-aħħar tal-perjodu ta' espressjoni billi jitqiegħdu fuq bażi fil-medjum mhux selettiv.

Jekk is-sustanza tat-test tkun posittiva fit-test tal-L5178Y TK+/-, il-qies tal-kolonji għandu jiġi rilevat fuq għall-inqas waħda mill-kulturi tat-test (l-ogħla konċentrazzjoni posittiva) u fuq il-kontrolli negattivi u posittivi. Jekk is-sustanza tat-test hi negattiva fit-test L5178Y TK+/-, il-qies tal-kolonji għandu jiġi rilevat fuq il-kontrolli negattivi u posittivi. Fi studji li jużaw il-TK6TK+/-, għandu jitwettaq ukoll il-qies tal-kolonji.

▼B

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

L-informazzjoni għandha tinkludi d-determinazzjoni taċ-ċitossiċità u l-vijabilità, l-għadd ta' kolonji, u l-frekwenzi ta' mutazzjonijiet għall-kulturi ta' trattament u ta' kontroll. Fil-każ ta' rispons posittiv fit-test tal-L5178Y TK+/-, il-kolonji jingħaddu billi jintuża l-kriterju ta' kolonji żgħar u kbar f'għall-inqas konċentrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test (l-ogħla konċentrazzjoni posittiva) u fuq il-kontroll negattiv u posittiv. In-natura molekulari u ċitoġenetika ta' kolonji ta' mutazzjonijiet kemm kbar kif ukoll żgħar ġiet esplorata fid-dettall (23) (24). Fit-test tat-TK+/-, il-kolonji jingħaddu billi jintuża l-kriterju ta' tkabbir normali (kbar) u tkabbir bil-mod (żgħar) ta' kolonji. (25). Iċ-Ċelloli ta' mutazzjoni li jkunu sofrew l-aktar ħsara ġenetika estensiva għandhom żminijiet ta' duplikazzjoni aktar prolongati u għalhekk jiffurmaw kolonji żgħar. Din il-ħsara tipikament tinfirex fl-iskala mit-telf tal-ġene intier għal devjazzjonijiet viżibbli karjotipikament tal-kromożomi. Il-presenza ta' kolonji żgħar mutanti ġiet assoċjata ma' kimiċi li jipproduċu alterazzjonijiet kbar fil-kromożomi (26). Ċelloli mutanti li jkunu ġew affettwati anqas serjament jikbru b'rati simili għal dawk ta' Ċelloli parentali u jifformaw kolonji kbar.

Għandu jingħata l-ammont ta' sopravivenza (effiċjenzi ta' klonazzjoni relattivi) jew l-iżvilupp totali relattiv. Il-frekwenza tal-mutazzjoni għandha tiġi espressa bħala n-numru ta' ċelluli mutanti paragunat man-numru ta' Ċelloli li jibqgħu ħajjin.

Għandha tingħata l-informazzjoni dwar il-kulturi differenti. B'żieda ma' dan, għandu jingħata sommarju ta' l-informazzjoni kollha fil-forma ta' tabella.

Ma hemm l-ebda ħtieġa għall-verifika ta' rispons posittiv ċar. Ir-riżultati dubbjużi għandhom jiġu ċċarati bżaktar testijiet preferibbilment billi jkun hemm modifika fil-kundizzjonijiet ta' l-esperiment. Riżultati negattivi għandhom jiġu konfermati fuq bażi ta' każ b'każ. F'dawk ilkażijiet fejn il-konferma ta' riżultati negattivi mhijiex kkunsidrata bħala meħtieġa, għandha tingħata ġustifikazzjoni. Għandha tiġi kkunsidrata l-modifika tal-parametri ta' studju biex tkabbar il-medda tal-kundizzjonijiet valutati f'esperimenti li jsiru wara minħabba f'riżultati dubbjużi jew negattivi. Parametri ta' studju li jistgħu jiġu modifikati jinkludu l-intervall bejn id-doži valutati u l-kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Hemm ħafna kriterji biex jiġi stabbilit risultat posittiv, bħal żieda relatata mal-konċentrazzjoni jew żieda riproduċibbli fil-frekwenza ta' mutazzjonijiet. L-ewwel għandha titqies ir-rilevanza bijoloġika tar-risultati. Jistgħu jintużaw metodi ta' statistika bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-risultati tat-test. Is-sinjifikanza statistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal rispons posittiv.

Sustanza ta' test li dwarha ir-risultati ma jilħqux l-kriterji fuq imsemmija hija meqjusa bħala mhux mutaġenika f'din is-sistema.

▼B

Għalkemm il-biċċa l-kbira ta' l-istudji jagħtu risultati ċari posittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni mogħtija ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività tas-sustanza tat-test. Ir-risultati jistgħu jibqgħu dubbjuż jew mhux ċari minkejja n-numru ta' drabi li jiġi ripetut l-esperiment.

Risultati posittivi mit-test tal-mutazzjoni tal-ġene taċ-ċellula tal-mammiferi *in vitro* jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq mutazzjonijiet tal-ġene fiċ-Ċelloli ta' kulturi ta' mammiferi użati. Rispons popsittiv dwar il-konċentrazzjoni li huwa riproduċibbli huwa ta' valur kbir. Risultati negattivi jindikaw li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloqx mutazzjonijiet tal-ġene fiċ-Ċelloli ta' kulturi ta' mammiferi użati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jkun fih l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz;

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Ċelloli:

— tip u għejun taċ-Ċelloli;

— numru ta' kulturi taċ-Ċelloli;

— numru ta' passaġġi, jekk ikun applikabbli;

— metodi għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-Ċelloli, jekk jkun applikabbli;

— assenza tal-mikoplasma.

Kundizzjonijiet tat-test:

— raġuni prinċipali għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u għadd ta' kulturi inklużi, eż. informazzjoni dwar ċitotossiċità u limitazzjonijiet dwar solubbilità, jekk ikunu disponibbli;

— komposizzjoni tal-medja, konċentrazzjoni CO_2;

— konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— volum tal-mezz u sustanza tat-test miżjuda;

— temperatura ta' l-inkubazzjoni;

— perjodu ta' inkubazzjoni;

— kemm idum it-trattament;

— densità taċ-ċellula waqt it-trattament;

— tip u komposizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika, inklużi krierji ta' aċċettabilità;

— kontrolli pożittivi u negattivi;

▼B

— tul tal-perjodu ta' espressjoni (inkluż in-numru ta' ċelluli fiż-żriegħ, u skedi ta' subkulturi u alimentazzjoni, jekk ikun xieraq);

— aġenti selettivi;

— kriterji biex it-testijiet jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;

— metodi użati biex jingħadd in-numru ta' Ċelloli viabbli u mutanti;

— definizzjoni ta' kolonji li dwarhom jitqiesu l-qies u t-tip (inklużi kriterji għal kolonji "żgħar" u "kbar", kif xieraq).

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità;

— sinjali ta' preċipitazzjoni;

— informazzjoni dwar pH u l-osmolalità waqt l-espożizzjoni għas-sustanza tat-test, jekk ikun stabbilit;

— qies tal-kolonja jekk reġistrat għall-inqas għall-kontrolli negattivi u posittivi;

— adegwatezza tal-laboratorju biex jiġu żvelati mutazzjonijiet f'kolonji żgħar bis sistema L5178Y TK+/-, fejn ikun xieraq;

— relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;

— analiżi statistiċi, jekk ikun hemm;

— informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin negattiv (solvent/mezz) u pożittiv;

— informazzjoni storika dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, bil-meded, mezzi u devjazzjonijiet standard;

— frekwenza ta' mutazzjonijiet.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindal, K.R. (eds.) (1987), Banbury Report 28; Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E.H.Y. and Malling H.V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res. 94, pp. 467-485.

(4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 394-403.

▼B

(5) Aaron, C.S., and Stankowski, Jr. L.F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, Mutation Res. 223, pp. 121-128.

(6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res. 312, pp. 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res. 257, pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 115, pp. 225-251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 196, pp. 17-36.

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, Mutation Res., 189, pp. 135-141.

(11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, Mutation Res., 216, pp. 9-17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal,, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate – and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate – and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, Mutation Res., 160, pp. 133-147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/TK+/- -TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J., ed., Cambirdge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccoro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome- Activated Dimethylnitrosamine, Mutation Res. 46, pp. 365-373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res. 31, pp. 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK+/- – Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, Mutat. Res. 59, pp. 61-108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res. 113, pp. 173-215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis 7, pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polycholrinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Ticc, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents, New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental Mutagenesis, 5, pp. 795-801.

(23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, pp. 51-55.

(24) Moore, M. M., Clive, D. Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluoronthymidine, Resistant (TFT+) Mutants of L5178Y/TK+/- – Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res. 151, pp. 161-174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, Mutation Res. 229, pp. 89-102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- – 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, Mutagenesis, 5, pp. 609-614.

▼B

B.18. **DANNI URIMEDJITAD-DNA -SINTESI MHUX FL-ISKEDATAD-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' Ċelloli mammiferi li m'humhiex fil-faži 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-Ċelloli trattati. Ċelluli 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-Ċelloli.

Kulturi primarji ta' hepatocytes tal-ġrieden, limfoċite tal-bnedmin u razez taċ-Ċelloli stabbiliti (eż. fibroblast tad-diplojde tal-bnedmin) jistgħu jintużaw fl-analiżi.

Iċ-Ċelloli għandhom ikunu esposti għall-kimika tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika xierqa.

Kundizzjonijiet tat-test

Numru ta' kulturi

Għall-inqas żewġ kulturi ta' Ċelloli għall-awtoradjografija u sitt kulturi (jew inqas jekk iġġustifikat b'mod xjentifiku) għad-determinazzjonijiet LSC UDS huma meħtieġa għal kull punt sperimentali.

▼B

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-aċetilaminofluworin (2-AAF). Fil-każ ta' razez ta' Ċelloli 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.

Ċelloli

Mezzi għat-tkabbir xierqa, il-konċentrazzjoni CO_2, it-temperatura u l-umdità għandhom ikunu użati fil-manteniment tal-kulturi. Razez taċ-Ċelloli 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-Ċelloli 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-Ċelloli 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.

▼B

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-Ċelloli, 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-Ċelloli stabbiliti u limfoċiti

Tekniċi awtoradjografiċi: Il-kulturi taċ-Ċelloli 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' Ċelloli. 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-Ċelloli fil fażi S għandu jkun imwaqqaf kif deskritt hawn fuq; iċ-Ċelloli mbagħad għandhom ikunu esposti għall-kimika tat-test kif deskritt għall-awtoradjografija. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-inkubazzjoni, id-DNA għandu jinħareġ miċ-Ċelloli 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-tekniċI 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-Ċelloli 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.

▼B

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-Ċelloli użati, id-densità u n-numru tal-passaġġ waqt it-trattament, in-numru ta' kulturi ta' Ċelloli;

— il-metodi użati biex jinżammu l-kulturi taċ-Ċelloli 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' Ċelloli fil-faži 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.

▼B

3.2. IL-VALUTAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

▼B

B.19. **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 fttit 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-Ċelloli.

Ċelloli mammiferi *in vitro* huma esposti għall-kimika tat-test b'sistema 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-Ċelloli fi stat ta' mitosi simili għall-metafasi (c-metafasi), iċ-Ċelloli huma maħsuda u jsiru l-preparazzjonijiet tal-kromosomi.

1.5. KRITERJI GĦALL-KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. *Preparazzjonijiet*

— Fl-analiżi jistgħu jintużaw kulturi primarji, (limfoċiti tal-bnedmin) jew razez taċ Ċelloli stabbiliti (eż. Ċelloli ovarji tal-ħamsters ċiniżi). Ir-razez taċ-Ċelloli għandhom ikunu kkontrollati għall-kontaminazzjoni tal-*Mycoplasma*.

— Għandhom jintużaw mezzi tal-kultura u kundizzjonijiet 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-Ċelloli. Il-konċentrazzjoni finali ta' vettura fis-sistema tal-kultura m'għandhiex taffettwa b'mod sinifikattiv il-vijabilità jew ir-rata ta' tkabbir taċ-Ċelloli u l-effetti fuq il-frekwenza SCE għandhom ikunu kontrollati b'solvent ta' kontroll,

▼B

— Iċ-Ċelloli 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.

1.6.2. *Kundizzjonijiet għat-test*

1.6.2.1. *Numru ta' kulturi*

Għandhom jintużaw għall-inqas kulturi doppji għal kull punt sperimentali.

1.6.2.2. *L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi*

Kontrolli pożittivi, li jużaw kemm kompost attiv direttkif 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.

1.6.2.3. *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-Ċelloli. 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 għattest għandha tkun determinata skond il-każ.

1.6.3. *Proċedura*

1.6.3.1. *Preparazzjoni tal-kulturi*

Ir-razez taċ-Ċelloli 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 ºC. 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 ºC.

▼B

1.6.3.2. *It-trattament*

Iċ-Ċelloli 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-Ċelloli f'ċerti każijiet. Ċelluli 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-espożizzjoni, iċ-Ċelloli jinħaslu mis-sustanza tat-test u jiġu kulturati għal żewġ dawriet ta' replika fil-preżenza ta' BrdU għall-ħin sħiħ tal-kultura ta' żewġ ċikli ta' Ċelloli.

Kulturi tal-limfoċita tal-bnedmin huma trattati waqt li jkunu f'kundizzjoni semisinkronika.

Iċ-Ċelloli huma analizzati fit-tieni diviżjoni tagħhom wara t-trattament, bl-assigurazzjoni li l-istadji taċ-ċikli taċ-Ċelloli 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-Ċelloli sabiex titnaqqas sal-minimu il-fotolisi ta' DNA li fiha l-BrdU.

1.6.3.3. *Il-ħsad taċ-Ċelloli*

Il-kulturi taċ-Ċelloli huma trattati b'inibitur tal-magħżel (eż. l-kolkiċina) bejn siegħa u erba' siegħat qabel il-ħsad. Kull kultura hija maħsuda u proċessata b'mod separat għall-preparazzjoni tal-kromosomi.

1.6.3.4. *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).

1.6.3.5. *L-Analiżi*

In-numru ta' Ċelloli 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' Ċelloli 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.

▼B

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jkollu, fejn huwa possibbli, l-informazzjoni il ġejja:

— Iċ-Ċelloli użati, il-metodi użati biex jinżammu l-kulturi taċ-Ċelloli;

— Il-kundizzjonijiet 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' Ċelloli 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

▼B

B.20. **TEST REĊESSIV 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 tħassir 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-kundizzjoni 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.

▼B

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.

▼B

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 F2 stabbiliti, in-numru ta' kulturi F2 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-kundizzjonijiet 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

▼B

B.21 **TEST TAT-TIBDILTAL-ĠENI F'ĊELLULIMAMMIFERI *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-Ċelloli mammiferi jistgħu jintużaw għall-iskoperta ta' tibdil ikkaġunat minn sustanzi kimiċi. Linji taċ-Ċelloli li jintużaw ħafna jinkludu L5178Y ċelluli tal-limfoma tal-ġrieden u l-linji CHO u V-79 taċ-Ċelloli 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) [21] 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. Ċelloli 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-Ċelloli 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-Ċelloli u ċ-ċitotossiċità. B'hekk iċ-Ċelloli mutanti jistgħu jipproliferaw fil-preżenza ta' BrdU, FdU jew TFT filwaqt li ċ-Ċelloli normali, li fihom it-thymidine kinase, ma jistgħux. B'mod simili, iċ-Ċelloli 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' Ċelloli f'mezz li fih l-aġent selettiv għall-iskoperta ta' Ċelloli mutanti, u f'mezz mingħajr l-aġent selettiv biex ikunu determinati ċ-Ċelloli 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-Ċelloli.

1.5. KRITERJI GĦALL-KWALITÀ

Xejn

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Preparazzjonijiet

Ċ e l l o l i

Hemm varjetà ta' linji ta' Ċelloli disponibbli għall-użu f'din l-analiżi. Dawn jinkludu subkloni ta' L5178Y, Ċelloli CHO jew Ċelloli V-79 b'sensitività murija għall-mutaġeni kimiċi, effiċjenza għolja ta' l-ikklonjar u frekwenza baxxa ta' tibdil spontanju. Iċ-Ċelloli jistgħu ikunu kkontrollati b'mod perjodiku għall-istabilità tal-karjotip u għandhom ikunu kkontrollati għall-kontaminazzjoni tal-Mycoplasma. Jistgħu jintużaw tipi oħra ta' Ċelloli jekk il-validità tagħhom bħala analiżi tat-tibdil tal-ġeni kkaġunat mill-kimiċi tista' tkun kompletament dokumentata.

▼B

Mezz

Mezzi ta' kultura u kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni xierqa (eż. temperatura, vettura għall-kultura, konċentrazzjonijiet ta' CO2 u umdità) għandhom jintużaw. Mezzi u sera għandhom jintgħażlu skond is-sistemi selettivi u t-tipi ta' Ċelloli 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-Ċelloli. Il-konċentrazzjoni finali tal-vettura fis-sistema tal-kultura m'għandhiex taffettwa il-vijabilità tar-rata tat-tkabbir.

L-attivazzjoni metabolika

Iċ-Ċelloli 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' Ċelloli 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.

Kundizzjonijiet 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.

▼B

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-Ċelloli għandhom ikunu esposti għal perjodu ta' ħin xieraq, fil-biċċa l-kbira tal-każijiet bejn sagħtejn u ħames siegħat huwa effettiv. Ċelluli 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-Ċelloli 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-Ċelloli 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' Ċelloli 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' Ċelloli, il-metodi biex jinżammu l-kulturi taċ-Ċelloli;

— il-kundizzjonijiet tat-test: il-komposizzjoni tal-mezzi, il-konċentrazzjoni ta' CO2, 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' Ċelloli 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-kundizzjonijiet 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' Ċelloli 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

▼B

B.22. **TEST LETALI DOMINANTI TAL-MAMMALI GERRIEMA**

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-espożizzjoni 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' Ċelloli (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.

▼B

Kundizzjonijiet 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.

▼B

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-Ċelloli 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 feminili. 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;

▼B

— 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

▼B

B.23. **TEST DWAR ANORMALITÀ FIL-KROMOŻOMI SPERMATOGONI TAL-MAMMIFERI**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 483, Test dwar Anormalità fil-Kromożomi Spermatogoni tal-Mammiferi (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

L-għan tat-test *in vivo* dwar anormalitajiet fil-kromożomi spermatogoni tal-mammiferi huwa biex jiġu identifikati sustanzi li jikkawżaw anormalitajiet strutturali fil-kromożomi fiċ-Ċelloli spermatogoni tal-mammiferi (1) (2) (3) (4) (5). Anormalitajiet strutturali jistgħu jkunu ta' żewġ tipi, kromożomi jew kromatidi. Fil-maġġoranza ta' mutaġeni kimiċi, anormalitajiet imġiegħela huma tat-tip kromatidu, iżda jirrikorru wkoll anormalitajiet tat-tip ta' kromożomi. Dan il-metodu mhux intiż biex jitkejlu l-anormalitajiet numeriċi u ma jintużax bħala rutina għal dak il-għan. Mutazzjonijiet fil-kromożomi u ġrajjiet relatati huma l-kawża ta' ħafna mard ġenetiku fil-bniedem.

Dan it-test ikejjel l-ġrajjiet tal-kromożomi fiċ-Ċelloli spermatogoni u, għalhekk, hu maħsub li jipprevedi l-mutazzjonijiet ġenetiċi fiċ-ċelluli ġerminali.

Annimali gerriema jintużaw generalment f'dan it-test. Dan it-test ċitoġenetiku jiżvela anormalitajiet fil-kromożomi f'mitosi spermatogoni. Ċelloli oħra mmirati mhumix l-oġġett ta' dan il-metodu.

Sabiex jiġu żvelati anormalitajiet tat-tip kromatid f'Ċelloli spermatogoni, għandha tiġi eżaminata l-ewwel diviżjoni taċ-ċellula mitotika qabel ma jintilfu dawn il-leżjonijiet f'diviżjonijiet sussegwenti taċ-Ċelloli. Tista' tinkiseb informazzjoni addizzjonali minn Ċelloli spermatogoni trattati bl-analisi tal-kromożomi mejotiċi għal anormalitajiet tat-tip tal-kromożomi fil-metafaża tad-dijakinesis I meta ċ-Ċelloli ttrattati jsiru spermatoċiti.

Dan it-test *in vivo* huwa intiż biex jinvestiga jekk mutaġeni ta' Ċelloli somatiċi jkunux attivi f'Ċelloli ġerminali. B'żieda ma' dan, it-test spermatogonu huwa rilevanti fil-valutazzjoni ta' perikli mutaġeniċi għax jippermetti l-kunsiderazzjoni ta' fatturi ta' metaboliżmu *in vivo*, farmakokinetika u proċessi ta' tiswija ta' DNA.

Jeżisti numru ta' ġenerazzjonijiet ta' spermatogoni fit-testikoli bi spettru ta' sensitività għat-trattament kimiku. Għalhekk, l-anormalitajiet żvelati jirrappreżentaw rispons medju ta' popolazzjonijiet ta' Ċelloli spermatogoni ttrattati, bi predominanza ta' Ċelloli spermatogoni differenzati li jkunu aktar numeruż. Skond il-posizzjoni tagħhom fit-testikoli, ġenerazzjonijiet differenti ta' spermatogoni jistgħu jew ma jistgħux ikunu esposti għal ċirkolazzjoni ġenerali, minħabba fil-barriera fiżika u fiżjoloġika ta' ċelluli Sertoli u l-barriera ematotestikolari.

Jekk hemm xiedha li s-sustanza tat-test, jew metabolit reattiv, ma jwasslux għat-tessut immirat, mhux xieraq li jintuża dan it-test.

Ara ukoll Introduzzjoni ġenerali Taqsima B.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Anormalità tat-tip kromatidu: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-ġdid bejn kromatidi.

Anormalità tat-tip tal-kromożomi: ħsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-ġdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

Vojt: leżjoni akromatika iżgħar mill-wisgħa ta' kromatid wieħed, u b'misallinjament minimu tal-kromatidi.

Anormalità numerika: bidla fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristku normali ta' Ċelloli utilizzati.

Poliplojdi: multiplu tan-numru aplojdu ta' kromożomi (*n*) minbarra n-numru diplojdu (jiġifieri 3*n*, 4*n*, eċċetera).

Anormalità strutturali: bidla fl-istruttura tal-kromożomi li wieħed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku ta' l-istadju metafażiku tad-diviżjoni ta' ċelluli, osservati bħala tħassir u biċċiet, bidliet minn ġewwa u bidliet bejniethom.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Annimali huma esposti għas-sustanza tat-test b'rotta xierqa ta' espożizzjoni u huma sakrifikati f'ħinijiet xierqa wara t-trattament. Qabel ma jiġu sakrifikati, l-annimali huma ttrattati b'sustanza li twaqqaf il-metafaża (eż. kolċiċina jew Colcemid®). Imbagħad isiru preparazzjonijiet ta' kromożomi miċ-Ċelloli ġerminali u jiġu mtebbgħin, u ċ-Ċelloli metafażiċi jiġu analizzati għal anormalitajiet fil-kromożomi.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Selezzjoni ta' l-ispeċi ta' l-annimali*

Normalment jintużaw ħamsters ċiniżi u ġrieden. Madankollu, jistgħu jintużaw l-annimali maskili ta' speċi oħra ta' mammiferi xierqa. Għandhom jintużaw razez, li komunement jintużaw fil-laboratorji, ta' annimali adulti b'saħħithom u żgħar. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali għandha tkun minima u ma teċċedix ± 20 % tal-medja tal-piż.

1.4.1.2. *Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu*

Għandhom japplikaw il-kundizzjonijiet ġenerali msemmija fl-Introduzzjoni ġenerali għat-Taqsima B iżda l-mira dwar l-umditá għandha tkun 50-60 %.

1.4.1.3. *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Annimali adulti żgħar u b'saħħithom jiġu assenjati mingħajr skema għall-gruppi ta' kontroll u trattament. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li jiġu minimizzati effetti possibbli li jirriżultaw minn kif jitqiegħdu l-gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati wieħed wieħed. L-annimali jiġu akklimatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għall-inqas għal ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju.

▼B

1.4.1.4. *Preparazzjoni tad-doża*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewwbin jew sospiżi f'solventi jew kontenituri xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament ta' l-annimali. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiġu ttrattati direttament jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda għas-sustanza tat-test kemm-il darba l-informazzjoni dwar l-istabbilità ma turix laċċettabbilità tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Is-solvent/mezz ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doża użata, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanza tat-test. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra minflok dawk l-aktar magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Hu rakkomandat li kemm jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż.

1.4.2.2. *Kontrolli*

Għandhom jiġu inklużi f'kull test kontrolli pożittivi u negattivi fl-istess ħin (solvent/mezz). Ħlief għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod bħall-annimali fil-grupp ta' trattament.

Il-kontrolli pożittivi għandhom jipproduċu anormalitajiet strutturali fil-kromożomi *in vivo* fiċ-Ċelloli spermatogoni meta jiġu somministrati f'livelli ta' espożizzjoni li huma mistennija li jagħtu żieda li tkun tidher fuq l-isfond.

Doża ta' kontroll pożittiv għandhom jingħażlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tad-dijapożitivi kodifikati lil min jaqrahom. Huwa aċċettat li l-kontroll pożittiv jiġi somministrat minn rotta differenti minn dik tas-sustanza tat-test u jittieħed kampjun darba waħda biss. Barra minn dan, jista' jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontroll pożittivi relatati mal-klassi ta' kimiċi, meta dawn ikunu disponibbli. Eżempji ta' sustanzi ta' kontroll pożittivi jinkludu:

Sustanza	Nru CAS	Nru EINECS
Ċiklofosfamid Monojdrat taċ-ċiklofosfamid	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Ċiklohessilamina	108-91-8	203-629-0
Mitomiċin-C	50-07-7	200-008-6
Akrilamid monomeriku	79-06-1	201-173-7
Trietilenemelamina	51-18-3	200-083-5

Il-kontrolli negattivi, trattati biss bis-solvent jew bil-mezz, u mod ieħor trattati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, għandhom jiġu inklużi għal kull perjodu ta' teħid ta' kampjuni, sakemm ma jkunux disponibbli varjabbilità aċċettabbli bejn l-annimali u frekwenżi ta' Ċelloli b'anormalitajiet fil-kromożomi mill-informazzjoni storika tal-kontroll. Barra minn dan, għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakemm ma jkunx hemm informazzjoni ta' kontroll pubblikata u storika li turi li jkun hemm effetti ta' ħsara u mutaġeniċi bl-uzu tas-solvent/mezz magħżul.

▼B

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Numru ta' l-annimali**

Kull grupp ta' trattament u ta' kontroll għandu jinkludi fih għall-inqas ħames annimali maskili analizzabbli

1.5.2. **Skeda tat-trattament**

Is-sustanzi tat-test huma preferibbilment somministrati darba jew tnejn (jiġifieri bħala trattament singolu jew żewġ trattamenti). Is-sustanzi tat-test jistgħu wkoll jiġu somministrati bħala doża maqsuma, jiġifieri żewġ trattamenti fl-istess ġurnata separati b'mhux aktar minn ftit sigħat, biex tiġi faċilitata s-somministrazzjoni ta' volum qawwi ta' materjal. Reġimi ta' dożi oħra għandhom ikunu ġustifikati xjentifikament.

Fil-grupp ta' l-ogħla doża jittieħdu żewġ kampjuni wara t-trattament. Ladarba l-kinetika taċ-ċikli taċ-Ċelloli tista' tiġi influwenzata bis-sustanza tat-test, jintużaw ħinijiet għat-teħid ta' kampjuni wieħed bikri u l-ieħor tard madwar 24 u 48 siegħa wara t-trattament. Għal dożi ogħla mill-l-ogħla doża għandu jittieħed żin ta' teħid ta' kampjun ta' 24 siegħa jew ta' 1,5 it-tul taċ-ċiklu ta' ċellula wara t-trattament, sakemm ma jkunx magħruf li jkun hemm ħin ta' teħid ta' kampjun ieħor aktar xieraq għall-iżvelar ta' l-effetti.

B'żieda ma' dan, jistgħu jintużaw ħinijiet ta' teħid ta' kampjun oħra. Per eżempju fil-każ ta' kimiċi li jistgħu jikkawżaw telf ta' kromożomi, jew jistgħu jkollhom effetti indipendenti mill-fażi S, kull wieħed mill-ħinijiet ta' teħid ta' kampjuni huwa xieraq.

Il-konvenjenza ta' skeda ta' trattament ripetut għandha tiġi identifikata fuq bażi ta' każ b'każ. Wara skeda ta' trattament ripetut l-annimali għandhom imbagħad jiġu sakrifikati 24 siegħa (1,5 tul ta' ċiklu ta' ċellula) wara l-aħħar trattament. Jistgħu jintużaw ħinijiet ta' teħid ta' kampjun addizzjonali meta jkun xieraq.

Qabel is-sagrifiċċju, l-annimali huma injettati intraperitonalment b'doża xierqa ta' sustanza li twaqqaf l-metafaži (eż. Colcemid® jew kolċiċina). Wara dan, jittieħed kampjun mill-annimali f'intervalli xierqa. Għall-ġrieden dan l-intervall huwa ta' madwar 3-5 siegħat; għal Ħamsters ċiniżi dan l-intervall huwa ta' madwar 4-5 siegħat.

1.5.3. **Livelli ta' doża**

Jekk jitwettaq studju biex tiġi skoperta l-medda għax ma jkunx hemm disponibbli informazzjoni xierqa, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, jintużaw l-istess speċi, razza, sess u metodu ta' trattament li għandhom jintużaw fl-istudju prinċipali (7). Jekk ikun hemm tossiċità, jintużaw tliet livelli ta' doża għall-ewwel perjodu ta' teħid ta' kampjuni. Dawn il-livelli ta' doża għandhom jkopru medda mill-massimu għal ftit jew l-ebda tossiċità. L-ogħla doża hija mfissra bħala s-sinjali ta' tossiċità li jipproduċu d-dożi hekk li livelli ogħla tad-doża, bbażati fuq l-istess reġim ta' dożaġġ, huma mistennija li jikkawżaw il-mewt.

▼B

Is-sustanzi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi baxxi mhux tossiċi (bħal ma huma ormoni u nitroġeni) jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' l-issettjar tad-doži u għandhom jiġu valutati fuq bażi ta' każ b'każ. L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fiċ-Ċelloli spermatogoni (eż. riduzzjoni fil-paragun bejn mitosi spermatogoni u l-ewwel jew it-tieni metafasi mejotika; din ir-riduzzjoni ma għandhiex teċċedi 50 %).

1.5.4. **Test tal-limitu**

Jekk test ta' doża waħda ta' livell ta' għall-inqas 2 000 mg/kg piż tal-ġisem/ġurnata meta jitwettaq trattament wieħed, jew bħala żewġ trattamenti fl-istess ġurnata, ma jipproduċix effetti tossiċi li wieħed jinduna bihom, u jekk ma tkun mistennija l-ġenotossiċità fuq il-bażi ta' l-informazzjoni minn sustanzi strutturalment relatati, allura ma jitqiesx li jkun neċessarju li jsir studju komplet bl-użu ta' tliet livelli ta' dożaġġ. L-espożizzjoni umana mistennija tista' tindika l-ħtieġa ta' livell ogħla ta' doża li għandu jintuża fit-test tal-limitu.

1.5.5. **Somministrazzjoni ta' doži**

Normalment is-sustanza tat-test tiġi somministrata b'gavage billi jintuża tubu għall-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni, jew bl-injezzjoni intraperitonali. Fejn ikunu ġustifikati, jistgħu jiġu aċċettati rotot oħra ta' espożizzjoni. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jiġi somministrat b'gavage jew b'injezzjoni f'ħin wieħed jiddependi fuq il-qies ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 2 ml/100g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ogħla minn dawn għandu jkun ġustifikat. Ħlief fil-każ ta' sustanzi li jirritaw jew korroživi li normalment juru effetti aggravati b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbilita fil-volum tat-test għandha titnaqqas bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fuq il-livelli kollha tad-doża.

1.5.6. **Preparazzjoni tal-kromożomi**

Minnufih wara s-sagrifiċċju, jinkisbu s-sospensjonijiet taċ-Ċelloli minn test wieħed jew miż-żewġ testijiet, esposti għal soluzzjoni ipotonika u ffissati. Iċ-Ċelloli imbagħad jinfirxu fuq dijapożitivi u jingħataw kulur.

1.5.7. **Analiżi**

Għandhom jiġu analizzati għall-inqas 100 metafaži mferxin sew għal kull annimal (jiġifieri minimu ta' 500 metafaži kull grupp). Dan in-numru jista' jitnaqqas meta jiġi nnotat għadd kbir ta' anormalitajiet. Id-dijapożitivi kollha, inklużi dawk ta' kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati indipendentement qabel l-analiżi mikroskopika. Billi l-proċeduri ta' fissazzjoni jirriżultaw ħafna drabi fil-ksur ta' għadd ta' metafaži bit-telf ta' kromożomi, iċ-Ċelloli li jingħaddu għandu għalhekk ikun fihom numru ta' ċentromeri ugwali għan-numru 2n ± 2.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

L-informazzjoni dwar annimali individwali għandha tingħata f'forma ta' tabella. L-unità sperimentali hija l-annimal. Għal kull annimal għandhom jiġu valutati n-numru ta' Ċelloli b'anormalitajiet strutturali tal-kromożomi u in-numru ta' anormalitajiet fil-kromożomi f'kull ċellula. Għandhom jiġu elenkati t-tipi differenti ta' anormalitajiet strutturali fil-kromożomi bl-għadd u l-frekwenzi tagħhom għal gruppi ta' trattament u ta' kontroll. Il-vojt jiġi reġistrat separatament u jsir rapport dwaru iżda ġeneralment ma jiġix inkluż fil-frekwenza totali ta' l-anormalità.

▼B

Jekk tiġi osservata l-mitosi kif ukoll il-mejosi, il-paragun bejn mitosi spermatogoni u l-ewwel u t-tieni metafaži mejotiċi għandu jiġi determinat bħala misura ta' ċitossiċità għall-annimali kollha trattati u ta' kontroll negattiv f'kampjun totali ta' 100 ċellula divisibbli għal kull annimal biex jiġi stabbilit l-effett ċitotossiku possibbli. Jekk tiġi osservata mitosi biss, l-indiċi tal-mitosi għandu jiġi determinat f'għall-inqas 1 000 ċellula għal kull annimal.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Hemm ħafna kriterji biex jiġi stabbilit riżultat pożittiv, bħal ma hi żieda relatata mad-doża fl-għadd relattiv ta' Ċelloli b'anormalitajiet fil-kromożomi jew żieda ċara fin-numru ta' Ċelloli b'anormalitajiet fi grupp singolu ta' trattament fi żmien singolu ta' teħid ta' kampjuni. L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet (8), jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. L-importanza ta' l-istatistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal riżultat pożittiv. Riżultati ekwivoċi għandhom jiġu ċċarati b'testijiet ulterjuri preferibilment billi tintuża modifika tal-kundizzjonijiet ta' l-esperiment.

Sustanza ta' test li dwarha r-riżultati ma jilħqux il-kriterji fuq imsemmija titqies bħala mhux mutaġenika f'dan it-test.

Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività ta' sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ekwivoċi u inċerti irrispettivament min-numru ta' drabi li jirrepeti ruħu l-esperiment.

Ir-riżultati pożittivi minn test *in vivo* ta' anormalitajiet fil-kromożomi spermatogoni jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq anormalitajiet strutturali fiċ-Ċelloli ġerminali ta' l-ispeċi ttestjata. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloqx anormalitajiet fiċ-Ċelloli ġerminali ta' l-ispeċi ttestjata.

Għandha tiġi diskussa l-probabilità li s-sustanza tat-test jew il-metaboliti tagħha jilħqu t-tessut immirat.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jkun fih l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz;

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Annimali ttestjati:

— speċi/razza użati;

— numru u età ta' l-annimali;

— għejun, kundizzjonijiet dwar fejn jinżammu, dieta, eċċ.;

— piż individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test, inkluża l-medda ta' piż tal-ġisem, mezzi u devjazzjoni standard għal kull grupp.

▼B

Kundizzjonijiet tat-test:

— informazzjoni mill-istudju dwar il-medda, jekk ikun sar;

— raġuni prinċipali għall-għażla ta' livell tad-doża;

— raġuni prinċipali dwar ir-rotta ta' somministrazzjoni;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test;

— dettalji dwar is-somministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— raġjuni prinċipali għall-ħinijiet tas-sagrifiċċju;

— konverżjoni mill-konċentrazzjoni (ppm) tas-sustanza tat-test dieta/ilma għax-xorb għad doża attwali (mg/kg piż tal-ġisem/jum) jekk tkun applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata dwar l-iskedi ta' trattament u teħid ta' kampjuni;

— metodi biex titqies it-tossiċità;

— identità tas-sustanza li twaqqaf il-metafaża, il-konċentrazzjoni tagħha u kemm idum it-trattament;

— metodi tal-preparazzjoni tad-dijapożitivi;

— kriterji għall-għadd ta' anormalitajiet;

— numru ta' Ċelloli analizzati kull annimal;

— kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità;

— indiċi mitotiku;

— paragun bejn mitosi spermnatogoni u l-ewwel u t-tieni metafasi mejotiċi;

— tip u numru ta' anormalitajiet, mogħtija separatament għal kull annimal;

— numru totali ta' anormalitajiet għal kull grupp;

— relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;

— analiżi statistiċi, jekk ikun hemm;

— informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin negattiv;

— informazzjoni storika dwar kontroll negattiv (solvent/mezz), bil-meded, mezzi u devjazzjonijiet standard;

— informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin pożittiv;

— bidliet fil-plojdi, jekk jidhru.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunklużjonijiet.

▼B

4. **REFERENZI**

(1) Adler, I. D., (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477-484.

(2) Adler, I. D., (1984), Cytogenetic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, (ed.) S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, pp. 207-209.

(6) Adler, I. D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313-318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.24. **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-Ċelloli 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-Ċelloli 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-ċelloli 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.

▼B

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 tkunx 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-Ċelloli (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

(ċ) tikek pigmentati u bojod mqassmin bl-addoċċ fuq il-pil li huma preżunti li jirriżultaw minn tibdil somatiku (RS).

▼B

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

▼B

B.25. **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

Xejn.

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 F_1 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-metafaża tad-dijakinesi I ta' l-individwi maskili, jew irġiel F_1jew il-wild irġiel tan-nisa F_1. 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

Xejn.

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 użati. Jekk vettura hija użata 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 użati.

▼B

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 F_1. Minn ta' l-anqas 500 wild irġiel F_1 għandhom ikunu ttestjati għal kull grupp ta' doża. Jekk il-wild nisa F_1 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 użati 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-espożizzjoni 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 sebat 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 użat:

— L-ittestjar tal-fertilità ta' l-ulied F_1 u l-verifikazzjoni sussegwenti ta' dawk li possibilment iġorru t-traslokazzjoni bl-analiżi ċitoġenetika;

— L-analiżi ċitoġenetika ta' l-ulied irġiel F_1 kollha mingħajr għażla minn qabel bl-ittestjar tal-fertilità.

(a) L-ittestjar tal-fertilità

Il-fertilità mnaqqsa ta'l-individwu F_1 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.

▼B

L-osservazzjoni tad-daqs tal-boton: L-irġiel F_1 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 F_2 huma rrekordjati mal-wild u l-botnijiet huma mormija minn dak in-nhar 'l hemm. Jekk l-ulied nisa F_1 ikunu ttestjati l-ulied F_2 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 F_1 huma eliminati minn aktar testijiet jekk l-ewwel boton F_2 jilħaq jew jaqbeż il-valur normali predeterminat, altrimenti boton it-tieni jew it-tielet boton F_2 huwa osservat.

L-annimali F_1 li ma jistgħux ikunu klassifikati bħala normali wara l-osservazzjoni ta' sa tlett botnijiet F_2 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 F_1 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-metfaża 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 F_1 kollha huma spezzjonati ċitoġenetikament. Il-minimu ta' 25 ċellola tal-metafaża dijakineżi I għal kull raġel għandu jkun milħuq mikroskopikament. L-eżaminazzjoni tal-metafaża mitotika, fl-ispermatogonia jew l-għadma tal-mudullun, hija meħtieġa fl-irġiel F_1 bit-testikoli żgħar u t-tnaqqis mejotiku qabel id-dijakineżi jew mis-sospetti tan-nisa F_1. 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 mitożi kollha hija evidenza għall-kundizzjoni 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-ftiem huma rappurtati għal kull intervall ta' tgħammir.

▼B

Għall-assessjar tal-fertilità ta' l-annimali F_1, il-medja tad-daqs tal-boton ta' tgħammiriet kollha normali u d-daqsijiet tal-botnijiet individwali ta' dawk li jġorru t-traslokazzjoni F_1 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 F_1 huma rappurtati.

Għall-analiżi ċitoġenetika tal-metafażi-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 F_1 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 F_2 u r-riżultati ta' l-analiżi ċitoġenetika huma rappurtati.

Fejn ikunu possibli dawk li jġorru t-traslokazzjoni F_1 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-RAPPORTAĠĠ

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-kundizzjonijiet 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 ċitoġenetiċI u d-detallji ta' l-analiżi mikroskopika, preferibbilment bl-istampi;

— il-valutazzjoni statistika;

— id-diskussjoni tar-riżultati;

— l-interpretazzjoni tar-riżultati.

▼B

3.2 IL-VALUTAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. **IR-REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

▼B

B.26. **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**

Il-metodu għat-test tat-tossiċità orali sub-kronika huwa replika ta' l-OECD TG 408 (1998)

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kemikali, id-determinazzjoni tat-tossiċità orali sub-kronika bl-użu ta' doži repetuti tista' ssir wara li l-informazzjoni tal-bidu fuq it-tossiċità tinkiseb mit-testijiet għat-tossiċità b'doża akuta jew repetuta għal 28 jum. L-istudju ta' 90 jum jipprovdi informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibbli li faċilment jista' jkun hemm minħabba espożizzjoni repetuta fuq perjodu imtawwal ta' żmien li jkopri l-maturazzjoni u t-tkabbir minn wara l-ftim sal-faži adulta. L-istudju se jipprovdi informazzjoni fuq l-effetti tossiċi prinċipali, jindika l-organi bħala mira u l-possibiltà ta' akkumulazzjoni, u jista' jipprovdi kalkolu ta' livell ta' espożizzjoni bl-ebda effett avvers osservat li jista' jintuża fl-għażla tal-livelli ta' doża għal studji kroniċi u biex jiġu stabbiliti kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni umana.

Il-metodu jkompli jenfasizza l-*endpoints* newroloġiċi u jagħti indikazzjoni ta' effetti immunoloġiċi u riproduttivi. Tingħata importanza wkoll għall-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi bil-galbu ta' l-annimali, sabiex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni. Dan l-istudju għandu jippermetti l-identifikazzjoni tal-kemikali bil-potenzjal li jikkawżaw effetti newrotossiċi, immunoloġiċi jew organi riproduttivi, li jistgħu jwasslu għal iktar investigazzjoni bir-reqqa.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Id-doża: huwa l-ammont tas-sustanza tat-test somministrat. Id-doża tissarraf f'piż (g, mg) jew f'piż tas-sustanza tat-test per unit tal-piż ta' l-annimal għat-test (eż. Mg/kg), jew f'konċentrazzjonijiet dietetiċi kostanti (ppm).

Id-dożaġġ: huwa terminu ġenerali li jikkomprendi d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

NOAEL: hija l-abbrevjazzjoni għal *no-observed-adverse-effect level* (livell bl-ebda effett avvers osservat) u huwa l-ogħla livel ta' doża fejn l-ebda sejbiet relatati ma' trattament avers ma ġew osservati.

1.3 PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza sperimentali għanda tkun somministrata kuljum, b'mod orali, f'doži gradwali lil diversi gruppi ta' annimali sperimentali, doża waħda għal kull grupp għall-perjodu ta' 90 jum. Matul il-perjodu ta' somministrazzjoni, l-annimali huma osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju huma sottoposti għall-nekroskopija, u fi tmiem it-test dawk l-annimali li jsalvaw jiġu maqtula wkoll u sottoposti għan-nekroskopija.

▼B

1.4 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **It-tħejjija ta' l-annimali**

Għandhom jiġu użati annimali b'saħħithom li jkunu adattaw ruħhom għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 ijiem u li ma kienux suġġetti għal preoċeduri sperimentali qabel. L-annimali għat-test għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċje, ir-razza, is-sors, is-sess, il-piż u/jew l-età. L-annimali għandhom jiġu assenjati għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġġa jiġu minimizzati. Kull annimal għandu jkollu numru ta' identifikazzjoni.

1.4.2. **It-tħejjija tad-doża**

Is-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors jew fid-dieta jew fl-ilma għax-xorb. Il-metodu tas-somministrazzjoni orali jiddependi mill-għan ta' l-istudju, u mill-proprjetatjiet fiżiko/kimiċi tal-materjal għat-test.

Fejn hu meħtieġ, is-sustanza għat-test tinħall jew tiġi sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkomandabbli li, kull fejn hu possibbli, jiġi kkunsidrat l-ewwel l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni akwea, u wara tiġi kkunsidrata soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. Iż-żejt tal-qamħ) imbagħad bis-soluzzjoni possibbli f'mezzi oħra. Għall-mezzi li mhumiex ilma l-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa. L-istabilità tas-sustanza għat-test taħt il-kundizzjonijiet ta' somministrazzjoni għandha tiġi determinata.

1.4.3. **Il-Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.3.1. *L-annimali sperimentali*

L-ispeċi l-aktar preferit huwa l-far għalkemm jisgħu jintużaw speċi gerriema oħra, eż. Il-ġurdien. Għandhom jintużaw razez li huma komunement utilizzati fil-laboratorju ta' annimali żgħar u b'saħħithom. In-nisa qatt ma jkunu welldu u mhmiex tqal. Id-dożaġġ għandu jibda kemm jista' jkun malajr wara l-ftim u qabel ma l-annimali jkollhom disa' ġimgħat. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandux jaqbeż + 20 % tal-valur medju ta' kull sess. Fejn isir studju preliminari għal studju fit-tul fuq it-tossiċità kronika, annimali mill-istess razza u speċi għandhom jintużaw fiż-żewġ studji.

1.4.3.2. *In-numru u s-sess*

Mill-inqas 20 annimal (10 nisa u 10 rġiel) għandhom jintużaw f'kull livell tad-doża. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali ppjanati li jinqatlu qabel tmiem l-istudju. Skond l-għarfien ta' qabel dwar l-analogu kemikali jew magħluq, għandu jiġi kkunsidrat li jiżdied grupp satellita ta' għaxar annimali (ħamsa għal kull sess) fil-grupp ta' kontroll u ta' l-ogħla doża għall-osservazzjoni tar-riversibbiltà jew tal-persistenza ta' kwalunkwe effetti tossiċi, wara l-perjodu ta' trattament. It-tul ta' żmien ta' dan il-perjodu post-trattament għandu jiġi determinat b'mod xieraq skond l-effetti li ġew osservati.

▼B

1.4.3.3. *Il-livelli tad-doża*

Għandhom jintużaw mill-inqas tlett livelli ta' doża u kontroll wieħed, ħlief fejn hemm test ta' limitu (ara 1.4.3.4.). Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq ir-riżultati tad-doża repetuta jew ta' l-istudju tas-sejbiet tal-meddda u għandhom jikkunsidraw kwalunkwe data tossikoloġika u tossikokinetika disponibbli li teżisti għas-sustanza tat-test jew l-annimali relatati. Sakemm ma tkunx limitata min-natura fiżiko-kemikali jew l-effetti bijoloġiċi tas-sustanza għat-test, l-ogħla livell ta' doża għandu jiġi magħżul bl-għan li jġib it-tossiċità iżda mhux il-mewt jew it-tbatija qawwija. Sekwenza nieżla tal-livell ta' doża għandha tingħażel bl-għan li turi kwalunkwe rispons relata mad-dożaġġ u l-livell b'ebda effett avvers osservat (NOAEL) fl-iktar livell baxx tad-doża. Intervalli t*wo to four fold* huma ta' spiss ottimali biex jiġu ssettjati il-livelli nežlin tad-doża u ż-żieda tar-raba' grupp għat-test huwa ppreferut ta' spiss iktar mill-intervalli kbar (eż. iktar minn fattur ta' bejn wieħed u ieħor 6-10) bejn id-dożaġġi.

Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux trattat jew grupp ta' kontroll b'mezz jekk il-mezz jintuża fis-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test. Ħlief għat-trattament bis-sustanza għat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod ta' dawk fil-gruppi għat-test. Jekk jintuża l-mezz, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-mezz fl-ogħla volum użat. Jekk sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta u tikkawża dħul dietetiku mnaqqas, imbagħad grupp ta' kontroll li jkun ġie magħluf jista' jgħin jiddistingwu bejn tnaqqis minħabba l-palatabilità jew minħabba l-alterazzjonijiet tossikoloġiċi fil-mudell għattest.

Il-karatteristiċi tal-mezz u additivi oħra li ġejjin għandhom jiġu kkunsidrati kif xieraq: l-effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-retenzjoni tas-sustanza għat-test; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u x-xorb jew fuq l-istatus nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.4.3.4. *It-test tal-limitu*

Jekk test f'livell wieħed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/ġurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti b'avvers mhux osservat) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi relatati strutturalment, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika ħlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-ħtieġa li jiġi użat livell ogħla ta' doża.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Is-somministrazzjoni tad-doża**

L-annimali jingħataw id-dożaġġ bis-sustanza għat-test sebat ijiem kull ġimgħa għal perjodu ta' 90 jum. Kwalunkwe *regime* ta' dożaġġ ieħor, eż. Ħamest ijiem fil-ġimgħa, irid ikun ġustifikat. Meta s-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors, dan għandu jsir f'doża waħda bl-użu ta' tubu għall-istonku jew intubazzjoni *cannula* xierqa. Il-volum massimu tal-likwidu li jista' jiġi somministrat f'darba jiddependi mid-daqs ta' l-annimal. Il-volum m'għandux ikun iktar minn 1 ml/100g tal-piż tal-ġisem, ħlief fil-każ ta' soluzzjonijiet akwei fejn 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jintuża. Ħlief għal sustanzi korrużivi jew ta' irritazzjoni, li normalment jiżvelaw effetti agħar b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tipi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni sabiex tiżgura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

▼B

Għal dawk is-sustanzi somministrati permezz tad-dieta jew l-ilma għax-xorb huwa importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza għat-test involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza għat-test hija somministrata fid-dieta jew konċentrazzjoni dietetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal jistgħu jintużaw. L-użu alternattiv irid jiġi speċifikat. Għas-sustanza li tiġi somministrata bil-fors, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili kuljum, u aġġustata kif ikun meħtieġ sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Fejn qed jintuża studju ta' 90 jum bħala studju preliminarju għal dak li jtul dwar it-tossiċità kronika, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

1.5.2. **L-osservazzjonijiet**

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun mill-inqas ta' 90 jum. L-annimali fi grupp satellita li huma skedati għal *follow-up* ta' l-osservazzjonijiet għandhom jinżammu għal perjodu xieraq mingħajr trattament sabiex tidher il-persistenza ta', jew l-irkupru mill-effetti tossiċi.

L-osservazzjonijiet kliniċi ġenereali għandhom isiru mill-inqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin (ħinijiet) kuljum, waqt illi jiġi meqjus il-perjodu *peak* ta' l-effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni klinika ta' l-annimali għandha tiġi rrekordjata. Mill-inqas darbtejn kuljum, normalment fil-bidu u fi tmiem il-jum, l-annimali kollha jiġu spezzjonati għal sinjali ta' morbidità jew ta' mortalità.

Ta' l-inqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex ikun hemm lok għall-paraguni fi ħdan is-suġġett), u darba fil-ġimgħa wara dan, l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru għall-annimali kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa fejn jitpoġġew, preferebbilment f'arena standard u f'ħinijiet simili kull darba. Għandhom jiġu rrekordjati tajjeb, preferebbilment bl-użu ta' sistemi ta' mmarkar, definiti b'mod ċar mil-laboratorju għall-ittestjar. Għandu jsir sforz sabiex jiġi żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' l-osservazzjoni huma minimali. Is-sinjali nnutati għandhom jinkludu, iżda mhux ikunu limitati għalihom, it-tibdil fil-ġilda, fil-pil, fl-għajnejn, fil-membrani mukuża, l-okkorrenza ta' tnixxija u ta' l-eskrementi u ta' l-attività awtonomika (eż. il-lakrimazzjoni, il- *pilo-erection*, id-daqs tal-pupill, is-sistema respiratorja mhux normali). It-tibdil fil-mixja, fil-pożizzjoni u r-rispons għall-imaniġġjar kif ukoll il-preżenza ta' ċaqliq kloniku jew toniku, l-isterjotipi (eż. *grooming* eċċessiv, tidwir tond repetittiv) jew imġiba stramba (eż. Awto-mutilazzjoni, il-mixi b'lura) għandhom jiġu rrekordjati wkoll (1).

Lejn tmiem il-perjodu ta' l-espożizzjoni u mhux qabel il-11-il ġimgħa, għandha ssir reattività sensorjali għal stimuli ta' tipi differenti (1) (eż. awditorjali, stimuli viżwali u *proprioceptive*) (2), (3), (4), il-valutazzjoni tas-saħħa tal-qabda (5) u l-valutazzjoni *motor activity* (6). Dettalji oħra fuq il-proċeduri li jistgħu jsegwu qegħdin fir-referenzi rispettivi. Madankollu, il-proċeduri alternattivi apparti dawk referenzjati jistgħu jintużaw ukoll.

L-osservazzjonijiet funzjonali magħmula lejn tmiem l-istudju jistgħu jitħallew barra meta d-data fuq l-osservazzjonijiet funzjonali tista' tittieħed minn studji oħra u l-osservazzjonijiet kliniċi ta' kuljum ma wrew l-ebda deficits funzjonali.

▼B

Ħlief f'eċċezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu jitħallew barra wkoll għal gruppi li juru sinjali ta' tossiċità b'tali mod li jfixklu b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.

1.5.2.1. *Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/xorb*

L-annimali kollha għandhom jintiżnu mill-inqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ikel u tax-xorb għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza għat-test hija somministrata permezz ta' l-ilma għax-xorb, il-konsum ta' l-ilma għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa wkoll. Il-konsum ta' l-ilma jista' jitqies ukoll għal studji dietetiċi jew ta' ikel mogħti bil-fors li matulu l-attività tax-xorb tista' tiġi tinbidel.

1.5.2.2. *Il-ħematoloġija u l-Bijokemistrija Klinika*

Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn site imsemmija u maħżuna, jekk applikabbli, f'kundizzjonijiet xierqa. Fi tmiem il-perjodu għat-test, il-kampjuni jinġabru eżatti qabel jew bħala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali, u maħżuna f'kundizzjonijiet xierqa

L-eżaminazzjonijiet ħematoloġiċi li ġejjin għandhom isiru fi tmiem il-perjodu għat-test u meta kwalunkwe kampjuni tad-demm interim ikunu nġabru:*Haematocrit,* konċentrazzjoni ta' *haemoglobin,* l-għadd ta' l- *erythrocyte,* l-għadd totali u differenzjali tal-*leucocyte*, l-għadd tal- *platelet* u l-kejl tal-ħin/potenzjal tal-boċċi fid-demm.

Id-determinazzjonijiet tal-bijokemistrija klinika biex jinvestigaw effetti prinċipali tossiċi fit-tessuti u, speċifikament, l-effetti fuq il-kliewi u fuq il-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demm miksuba mill-annimali kollha eżatti qabel jew bħala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali (apparti ta' dawk li jinstabu qed imutu u/jew jinqatlu). B'mod simili għall-investigazzjonijiet ħematoloġiċi, jista' jsir it-teħid tal-kampjuni interim għat-testijiet bijokemikali kliniċi. Huwa rakkomandat is-sawm mal-lejl ta' l-annimali qabel it-teħid tal-kampjuni tad-demm ([1]). Id-determinazzjonijiet tal-plasma jew serum għandhom jinkludu is-sodju, il-putassa, il-glokożju, il-kolestorol totali, l-urea, in-nitroġenu fid-demm mill-urea, il-*creatinine*, il-proteini u l-albumin totali, u iktar minn żewġ enzimi li juru l-effetti hepatoċellulari (bħalma huma l-*alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase, u sorbitol dehydrogenase*). Il-kejl ta' enzimi addizzjonali (ta' oriġini epatika jew oħra) u aċidi tal-*bile* li jistgħu jipprovdu informazzjoni utli taħt ċerti ċirkostanzi, jista' jiġi nkluż ukoll.

B'għażla, id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina li ġejjin jistgħu jsiru waqt l-aħħar ġimgħa ta' l-istudju bl-użu tal-ġbir bil-ħin tal-volum ta' l-urina; l-apparenza, il-volum, l-*osmolality* jew gravità speċifika, pH, il-proteini, il-glukożju u d-demm/iċ-ċelloli tad-demm.

Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar tas-serum ta' ħsara ġenerali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet oħra li għandhom jitwettqu jekk il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza għat-test jistgħu, jew huma suspettati li jaffettwaw il-profili metaboliċi relatati jinkludu il-kalċju, il-fosforu, il-fasting triglycerides, l-ormoni speċifiċi, il-*methaemoglobin* u l-*cholinesterase*. Dawn iridu jiġu identifikati għall-kimiċi f'ċerti klassijiet jew fuq bażi ta' kull każ.

([1]) Għal numru ta' kejl fis-serum u fil-plasma, l-iktar għall-glukożju, is-sawm mal-lejl ikun iktar preferut. Ir-raġuni prinċipali għal din il-preferenza hi li l-varjabbiltà li qed tiżdied u li bla dubju se tirriżulta min-nuqqas ta' sawm, tgħatti l-effetti l-iktar moħbija u l-interpretazzjoni tkun iktar diffiċli. Min-naħa l-oħra, madankollu, is-sawm mal-lejl jista' jfixkel il-metaboliżmu ġenerali ta' l-annimali u, b'mod partikulari fl-istudji ta' l-għalf. Jista' jfixkel ukoll l-espożizzjoni ta' kuljum għas-sustanza tat-test. Jekk jiġi adottat is-sawm mal-lejl, id-determinazzjonijiet bijokemikali u kliniċi għandhom jitwettqu wara t-twettieq ta' l-osservazzjonijiet funzjonali ta' l-istudju.

▼B

Fuq kollox, hemm il-bżonn ta' attitudni flessibbli skond l-ispeċi u l-effett osservat u/jew mistenni mis-sustanza mogħtija.

Jekk id-data storika mhix adegwata, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-varjabbli ematoloġiċi u tal-bijokemistrija kliniċi għandhomx bżonn jiġu determinati qabel ma jibda d-dożaġġ u ġeneralment mhuwiex rakkomandabbli li din id-data tiġi ġġenerata qabel it-trattament (7).

1.5.2.3 *Nekropsija Grossa*

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu suġġetti għall-awtopsja sħiħa grossa ta' wara l-mewt li tinkludi eżaminazzjoni bir-reqqa tal-wiċċ tal-ġisem, l-orifiċi kollha, u l-kavitajiet tal-kranju, tat-toraċi u dawk addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-testi, l-*epididymides*, it-*thymus*, il-milsa, il-moħħ u l-qalb ta' l-annimali kollha (ħlief ta' dawk li jkunu qed imutu u/jew jiġu maqtula) għandhom jiġu trimmjati minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u għandhom ikunu mwieżna niedja malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex ma jinxfux.

It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni ħistopatoloġika maħsuba sussegwenti: il-feriti kbar kollha, il-moħħ (partijiet rappreżentattivi inklużi iċ-ċerebrum, iċ-ċerebelllum u l-*medulla/-pons*), il-korda spinali (fi tliet livelli: ċevikali, *mid-thoracic* u *lumbar*) il-glandoli *pituitary, thyroid, parathyroid, thymus, oesophagus, salivary*, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inklużi l-*Peyer's patches*), il-fwied, il-frixa, kliewi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-trakea u l-pulmuni (ippreservati bl-inflazzjoni bil-*fixative* imbagħad bl-immersjoni), l-aorta, il-*gonads*, l-utru, l-organi sesswali aċċessorili, il-glandola mammarja femminili, il-prostata, il-bużżieqa ta' l-urina, il-*gall bladder* (il-ġurdien), in-noduli limfatiċi (preferibbilment nodulu limfatiku wieħed li jkopri r-rotta ta' l-amministrazzjoni u oħra distanti mir-rotta ta' l-amministrazzjoni biex tkopri l-effetti sistematiċi), in-nerv periferali (*sciatic* jew *tibial*) preferebbilment viċin il-muskolu, u biċċa mill-mudullun (jew, *a fresh bone marrow aspirate*), il-ġilda u l-għajnejn (jekk ġew osservati xi tibdiliet waqt l-eżaminazzjonijiet oftalmoloġiċi). Is-sejbiet klinikali u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu li hemm bżonn jiġu eżaminati tessuti addizzjonali. Kwalunkwe organi li jistgħu jkunu organi-mira bbażati fuq il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza tat-test għandhom jiġu ppreservati.

1.5.2.4. *Il-ħispatoloġija*

Il-ħispatoloġija kompluta għandha titwettaq fuq l-organi u t-tessuti ppreservati ta' l-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doża għolja. Dawn l-eżaminazzjonijiet għandhom jiġu estiżi għall-annimali tal-gruppi ta' dożaġġ l-oħrajn ukoll, jekk it-tibdil relatat mat-trattament jiġi osservat fil-grupp ta' doża għolja.

1.5.2.5. Il-feriti grossi kollha għandhom jiġu eżaminati.

Meta jintuża grupp satellita il-ħistopatoloġija għandha ssir fuq it-tessuti u l-organi identifikati bħala li qed juru l-effetti fil-gruppi trattati.

▼B

DATA U RAPPORTAĠĠ

2.1. DATA

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali nstabu mejta waqt it-test jew li nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kwalunkwe mewt jew qtil uman, in-numru li juri sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż il-ħin ta' l-onset, it-tul, il-qawwa ta' kwalunkwe effetti tossiċi, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, it-tip ta' feriti u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip ta' ferita.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Is-sustanza għat-test:**

— In-natura fiżika, il-purità u il-proprjetajiet fiżiko-kemikali;

— Id-data ta' identifikazzjoni;

— Il-mezz (jekk inhu xieraq): il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz, jekk mhuwiex l-ilma.

2.2.2. **L-ispeċi għat-test:**

— l-ispeċi/is-silta użati;

— In-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— Is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, id-dieta eċċ.;

— Il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test

2.2.3. **Il-kundizzjonijiet għat-test:**

— Ir-*rationale* għall-għażla tal-livell tad-doża;

— Id-dettalji tat-tħejjija tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza għat-test, il-konċentrazzjoni miksuba u l-omoġeneità tat-tħejjija;

— id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— Id-dożi kif inhuma tabilħaqq (mg/kg piż tal-ġisem/jum), u l-fattur tal-konverżjoni mill-konċentrazzjoni tat-test għas-sustanza tad-dieta/l-ilma għax-xorb (ppm) għad-doża kif inhi tabilħaqq, jekk applikabbli;

— Id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma

2.2.4. **Ir-riżultati:**

— Il-piż tal-ġisem/it-tibdil fil-piż tal-ġisem;

— Il-konsum ta' l-ikel u ta' l-ilma jekk applikabbli;

— Id-data tar-rispons tossiku bis-sess u bil-livell tad-doża, inklużi s-sinjali tat-tossiċità;

▼B

— In-natura, il-qawwa u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (jekk humiex riversibbli jew le);

— Ir-riżultati ta' l-eżaminazzjoni oftalmoloġika;

— l-attività sensorjali, is-saħħa tal-qabda ta' l-id u l-valutazzjonijiet *motor activity;*

— it-testijiet ematoloġiċi bil-valuri *base-line* relevanti;

— it-testijiet tal-bijokemistrija klinika bil-valuri *base-line* relevanti;

— il-piż tal-ġisem terminali, il-piżijiet ta' l-organi u r-*ratios* tal-piż ta' l-organi u tal-ġisem;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet ħistopatoloġiċi kollha;

— Id-data ta' l-assorbiment jekk hi disponibbli;

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn hu xieraq;

Id-diskussjoni tar-riżultati;

Konklużjonijiet.

3.1. **REFERENZI**

IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233-236.

Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

Weingand K., Brown G., Hall R. *et al*. (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198-201.

▼B

B.27. **EŻAMI TA' TOSSIĊITÀ ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻI GĦAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊI TA' ANNIMALI MHUX GERRIEMA**

1. **METODU**

Il-metodu għat-test tat-tossiċità orali sub-kronika huwa replika ta' l-OECD TG 409 (1998)

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kemikali, id-determinazzjoni tat-tossiċità orali sub-kronika bl-użu ta' dożi repetuti tista' ssir wara li l-informazzjoni tal-bidu fuq it-tossiċità tinkiseb mit-testijiet għat-tossiċità b'doża akuta jew repetuta għal 28 jum. L-istudju ta' 90 jum jipprovdi informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibbli li faċilment jista' jkun hemm minħabba espożizzjoni repetuta għal perjodu ta' tkabbir mgħaġġel sal-faża adulta. L-istudju se jipprovdi informazzjoni fuq l-effetti tossiċi prinċipali, jindika l-organi bħala mira u l-possibiltà ta' akkumulazzjoni, u jista' jipprovdi kalkolu ta' livell ta' espożizzjoni bl-ebda effett avvers osservat li jista' jintuża fl-għażla tal-livelli ta' doża għal studji kroniċi u biex jiġu stabbiliti kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni umana

Dan il-metodu għat-test għandu jippermetti l-identifikazzjoni ta' l-effetti avversi minħabba l-espożizzjoni kemikali fl-ispeċi li mhumiex gerriema u għandu jintuża biss:

— fejn l-effetti osservati fi studji oħra jindikaw il-ħtieġa għal klarifikazzjoni/karatterizzazzjoni fit-tieni speċi, li mhix gerriema, jew

— fejn l-istudji tossikokinetiċi jindikaw li l-użu ta' speċi mhux gerriema speċifika hija l-iktar għażla relevanti għall-annimal tal-laboratorju, jew

— fejn raġunijiet speċifiċi oħra jiġġustifikaw l-użu ta' speċi li mhix gerriema.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-doża: huwa l-ammont tas-sustanza tat-test somministrat. Id-doża tissarraf f'piż (g, mg) jew f'piż tas-sustanza tat-test per unit tal-piż ta' l-annimal għat-test (eż. Mg/kg), jew f'konċentrazzjonijiet dietetiċi kostanti (ppm).

Id-dożaġġ: huwa terminu ġenerali li jikkomprendi d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

NOAEL: hija l-abbrevjazzjoni għal *no-observed-adverse-effect level* (livell bl-ebda effett avvers osservat) u huwa l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet relatati ma' trattament avvers ma ġew osservati.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza għat-test għandha tiġi somministrata kuljum, b'mod orali, f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' annimali sperimentali, doża waħda għal kull grupp għall-perjodu ta' 90 jum. Matul il-perjodu ta' somministrazzjoni, l-annimali huma osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju huma sottoposti għall-nekroskopija, u fi tmiem it-test dawk l-annimali li jsalvaw jiġu maqtula wkoll u sottoposti għan-nekroskopija.

▼B

1.4. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **L-għażla ta' l-ispeċi ta' l-annimali**

L-ispeċi li mhumiex gerriema l-aktar użat huwa l-kelb, li għandu jkun ta' razza definita. Il-*beagle* (kelb żgħir tal-kaċċa) jintuża ta' spiss. Jistgħu jintużaw ukoll speċi oħra, eż. ħanżir, u ħnieżer żgħar. Il-primati mhumiex rakkomandabbli u l-użu tagħhom għandu jkun ġustifikat. Għandhom jintużaw annimali żgħażagħ u b'saħħithom, u fil-każ tal-kelb, id-dożaġġ għandu jibda idealment mill-età ta' erba' sa sitt xhur u mhux aktar tard minn disa' xhur. Meta jsir studju preliminari għal dak iktar fit-tul dwar it-tossiċità kronika, l-istess speċi/razza għandha tintuża fiż-żewġ studji.

1.4.2. **It-tħejjija ta' l-annimali**

Għandhom jiġu użati annimali b'saħħithom li jkunu adattaw ruħhom għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju u li ma kinux suġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. It-tul ta' żmien ta' l-adattament jiddependi fuq l-ispeċi magħżula u s-sors tagħhom. Huma rakkomandati mill-inqas 5 ijiem għall-klieb jew ħanżir tar-razza li ġejjin minn kolonja residenti u mill-inqas ħmistax għal dawk l-annimali li ġejjin minn sorsi esterni. L-annimali għat-test għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċje, ir-razza, is-sors, is-sess, il-piż u/jew l-età. L-annimali għandhom jiġu assenjati bl-addoċċ għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid tal-gaġġa jiġu minimizzati. Kull annimal għandu jkollu numru ta' identifikazzjoni

1.4.3. **It-tħejjija tad-doża**

Is-sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta jew fl-ilma għax-xorb, permezz ta' l-għalf mogħti bil-fors jew fil-kapsuli. Il-metodu tas-somministrazzjoni orali jiddependi mill-għan ta' l-istudju, u mill-proprjetatjiet fiżiko/kimiċi tal-materjal għat-test.

Fejn hu meħtieġ, is-sustanza għat-test tinħall jew tiġi sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkomandabbli li, kull fejn hu possibbli, jiġi kkunsidrat l-ewwel l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni akwea, u wara tiġi kkunsidrata soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. Iż-żejt tal-qamħ) imbagħad bis-soluzzjoni possibbli f'mezzi oħra. Għall-mezzi li mhumiex ilma l-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa. L-istabilità tas-sustanza għat-test taħt il-kundizzjonijiet ta' somministrazzjoni għandha tiġi determinata

1.5. IL-PROĊEDURA

1.5.1. **In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Mill-inqas 8 annimali (erba' nisa u erba' rġiel) għandhom jintużaw f'kull livell tad-doża. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jiżdied bin-numru ta' annimali ppjanati li jinqatlu qabel tmiem l-istudju. Skond l-għarfien ta' qabel dwar is-sustanza jew l-analogu magħluq, għandu jiġi kkunsidrat li jiżdied grupp satellita ta' 8 annimali (erbgħa għal kull sess) fil-grupp ta' kontroll u ta' l-ogħla doża għall-osservazzjoni tar-riversibbiltà jew tal-persistenza ta' kwalunkwe effetti tossiċi, wara l-perjodu ta' trattament. It-tul ta' żmien ta' dan il-perjodu post-trattament għandu jiġi determinat b'mod xieraq skond l-effetti li ġew osservati.

▼B

1.5.2. **Id-dożaġġ**

Għandhom jintużaw mill-inqas tlett livelli ta' doża u kontroll wieħed, ħlief fejn hemm test ta' limitu (ara 1.5.3.). Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq ir-riżultati tad-doża repetuta jew ta' l-istudju tas-sejbiet tal-meddda u għandhom jikkunsidraw kwalunkwe data tossikoloġika u tossikokinetika disponibbli li teżisti għall-compound tat-test jew il-materjali relatati. Sakemm ma tkunx limitata min-natura fiżiko-kemikali jew l-effetti bijoloġiċi tas-sustanza għat-test, l-ogħla livell ta' doża għandu jiġi magħżul bl-għan li jġib it-tossiċità iżda mhux il-mewt jew it-tbatija qawwija. Sekwenza nieżla tal-livell ta' doża għandha tingħażel bl-għan li turi kwalunkwe rispons relata mad-dożaġġ u l-livell b'ebda effett avvers osservat (NOAEL) fl-iktar livell baxx tad-doża. Intervalli two to four fold huma ta' spiss ottimali biex jiġu ssettjati il-livelli nieżlin tad-doża u ż-żieda tar-raba' grupp għat-test huwa ppreferut ta' spiss iktar mill-intervalli kbar (eż. iktar minn fattur ta' bejn wieħed u ieħor 6-10) bejn id-dożaġġi.

Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux trattat jew grupp ta' kontroll b'mezz jekk il-mezz jintuża fis-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test. Ħlief għat-trattament bis-sustanza għat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod ta' dawk fil-gruppi għat-test. Jekk jintuża l-mezz, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-mezz fl-ogħla volum użat. Jekk sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta u tikkawża dħul dietetiku mnaqqas, imbagħad grupp ta' kontroll li jkun ġie magħluf jista' jgħin biex jiddistingwu bejn tnaqqis minħabba l-palatabilità jew minħabba l-alterazzjonijiet tossikoloġiċi fil-mudell għattest.

Il-karatteristiċi tal-mezz u additivi oħra li ġejjin għandhom jiġu kkunsidrati kif xieraq: l-effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-retenzjoni tas-sustanza għat-test; l-effetti fuq il-proprjetajiet kemikali tas-sustanza għat-test u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u x-xorb jew fuq l-istatus nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.5.3. **It-test tal-limitu**

Jekk test f'livell wieħed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/ġurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi mhux osservati) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika ħlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-ħtieġa li jiġi użat livell ogħla ta' doża.

1.5.4. **Is-somministrazzjoni tad-doża**

L-annimali jingħataw id-dożaġġ bis-sustanza għat-test sebat ijiem kull ġimgħa għal perjodu ta' 90 jum. Kwalunkwe *regime* ta' dożaġġ ieħor, eż. Ħamest ijiem fil-ġimgħa, irid ikun ġustifikat. Meta s-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors, dan għandu jsir f'doża waħda bl-użu ta' tubu għall-istonku jew intubazzjoni *cannula* xierqa. Il-volum massimu tal-likwidu li jista' jiġi somministrat f'darba jiddependi mid-daqs ta' l-annimal. Normalment il-volum għandu jinżamm baxx kemm jista' jkun. Ħlief għal sustanzi korrużivi jew ta' irritazzjoni, li normalment jiżvelaw effetti agħar b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni sabiex tiżgura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

▼B

Għal dawk is-sustanzi somministrati permezz tad-dieta jew l-ilma għax-xorb huwa importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza għat-test involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza għat-test hija somministrata fid-dieta jew konċentrazzjoni dietetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal jistgħu jintużaw. L-użu alternattiv irid jiġi speċifikat. Għas-sustanza li tiġi somministrata bil-fors, id-doża għandha tingħata f'ħinijiet simili kuljum, u aġġustata kif ikun meħtieġ sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Fejn qed jintuża studju ta' 90 jum bħala studju preliminarju għal dak li jtul dwar it-tossiċità kronika, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

1.5.5. **L-osservazzjonijiet**

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun mill-inqas ta' 90 jum. L-annimali fi grupp satellita li huma skedati għal *follow-up* ta' l-osservazzjonijiet għandhom jinżammu għal perjodu xieraq mingħajr trattament sabiex tidher il-persistenza ta', jew l-irkupru mill-effetti tossiċi.

L-osservazzjonijiet kliniċi ġenereali għandhom isiru mill-inqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin (ħinijiet) kuljum, waqt illi jiġi meqjus il-perjodu *peak* ta' l-effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni klinika ta' l-annimali għandha tiġi rrekordjata. Mill-inqas darbtejn kuljum, normalment fil-bidu u fi tmiem il-jum, l-annimali kollha għandhom jiġu spezzjonati għal sinjali ta' morbidità jew ta' mortalità.

Ta' l-inqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex ikun hemm lok għall-paraguni fi ħdan is-suġġett), u darba fil-ġimgħa wara dan, l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru għall-annimali kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa fejn jitpoġġew, preferebbilment f'arena standard u f'ħinijiet simili kull darba. Għandu jsir sforz sabiex jiġi żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' l-osservazzjoni huma minimali. Is-sinjali tat-tossiċità għandhom jiġu rrekordjati tajjeb, inklużi l-ħin ta' l-*onset,* il-grad u t-tul ta' żmien. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu, iżda mhux ikunu limitati għalihom, it-tibdil fil-ġilda, fil-pil, fl-għajnejn, fil-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxija u ta' l-eskrementi u ta' l-attività awtonomika (eż. il-lakrimazzjoni, il- *pilo-erection*, id-daqs tal-pupill, attività respiratorja mhux normali). Bidliet fil-mixja, fil-pożizzjoni u r-rispons għall-imaniġġjar kif ukoll il-preżenza ta' ċaqliq kloniku jew toniku, l-isterjotipi (eż. *grooming* eċċessiv, tidwir tond repetittiv) jew imġiba stramba għandhom jiġu rrekordjati.

L-eżaminazzjoni oftalmoloġika, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir xieraq ekwivalenti, Għandha ssir qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u fi tmiem l-istudju, preferibbilment fl-annimali kollha iżda għallinqas fil-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll. Jekk ikun hemm tibdil fl-għajnejn relatat mat-trattament l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati.

1.5.5.1. *Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/xorb*

L-annimali kollha għandhom jintiżnu mill-inqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ikel u tax-xorb għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza għat-test hija somministrata permezz ta' l-ilma għax-xorb, il-konsum ta' l-ilma għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa wkoll. Il-konsum ta' l-ilma jista' jitqies ukoll għal studji dietetiċi jew ta' ikel mogħti bil-fors li matulu l-attività tax-xorb tista' tinbidel.

▼B

1.5.5.2. *Il-ħematoloġija u l-Bijokemistrija Klinika*

Il-kampjuni tad-demm għandhom jittieħdu minn site imsemmija u maħżuna, jekk applikabbli, f'kundizzjonijiet xierqa. Fi tmiem il-perjodu għat-test, il-kampjuni jinġabru eżatti qabel jew bħala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali.

Il-ħematoloġija, inklużi l-*haematocrit*, il-konċentrazzjoni ta' *haemoglobin*, l-għadd ta' l-*erythrocyte*, l-għadd totali u differenzjali tal-*leukocyte*, l-għadd tal-*platelet* u l-kejl ta' potenzjal għall-boċċi (*clotting*) bħalma hu l-ħin ta' l-iffurmar tal-boċċi, il-ħin tal-*prothrombin*, jew il-ħin tat-*thromboplastin* għandhom jiġu investigati fil-bidu ta' l-istudju, imbagħad jew f'intervalli ta' xhur jew f'nofs triq tal-perjodu tat-test u fl-aħħarnett fi tmiemu.

Id-determinazzjonijiet tal-bijokemistrija klinika biex jinvestigaw effetti prinċipali tossiċi fit-tessuti u, speċifikament, l-effetti fuq il-kliewi u fuq il-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demm miksuba mill-annimali fil-bidu, imbagħad f'intervalli ta' xhur jew f'nofs it-test u fl-aħħarnett fi tmiem il-perjodu tat-test. Iż-żoni tat-test li għandhom jiġu kkunsidrati huma l-bilanċ electrolyte, il-metaboliżmu tal- carbohydrate, u l-funzjoni tal-fwied u l-kliewi. L-għażla tat-testijiet speċifiċi tkun influwenzata mill-osservazzjonijiet ta' l-azzjoni tas-sustanza għattest. L-annimali għandhom ikunu sajmin għal perjodu xieraq għall-ispeċi u qabel it-teħid tal-kampjuni tad-demm. Id-determinazzjonijiet suġġeriti jinkludu l-kalċju, il-fosfru, il-klorur, is-sodju, il-potassju, il-glukosju swami, l-*alanine*, l-*amino-transferase*, l-*aspartate aminotransferase*, l-*ornithine decarboxylase*, il- *gamma glutamyl transpeptidase*, l-*urea nitrogen*, l-*albumin*, il-*blood creatinine*, it-total tal-*bilirubin* u t-total tal-kejl tas-*serum protein*.

Id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina għandhom isiru għal-linqas fil-bidu, imbagħad fin-nofs u fl-aħħarnett fi tmiem l-istudjubl-użu tal-ġbir bil-ħin tal-volum ta' l-urina. Id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina jinkludu l-apparenza, il-volum, l- *osmolality* jew il-gravità speċifika, il-pH, il-proteini, il-glukożju u d-demm/iċ-ċelloli tad-demm. Parametri addizzjonali jistgħu jintużaw fejn hu meħtieġ biex l-investigazzjoni ta' l-effett(i) osservat(i) tiġi estiża.

Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar ta' ħsara ġenerali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet oħra li jistgħu jkunu meħtieġa għal evalwazzjoni tossikoloġika adegwata jinkludu l-analiżi tal-lipidi, ta' l-ormoni, tal-bilanċ aċdu/-bażi, tal- methaemoglobin, u ta' l-inibizzjoni tal- cholinesterase. Il-bijokemistrija klinika addizzjonali tista' tintuża fejn hu meħtieġ sabiex l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati tiġi estiża. Dawn iridu jiġu identifikati għall-kimiċi f'ċerti klassijiet jew fuq bażi ta' kull każ.

Fuq kollox, hemm il-bżonn ta' attitudni flessibbli skond l-ispeċi u l-effett osservat u/jew mistenni mis-sustanza mogħtija.

1.5.5.3. *Nekropsija Grossa*

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu suġġetti għall-awtopsja sħiħa grossa ta' wara l-mewt li tinkludi eżaminazzjoni bir-reqqa tal-wiċċ tal-ġisem, l-orifiċi kollha, u l-kavitajiet tal-kranju, tat-toraċi u dawk addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied bil-*gall bladder*, il-kliewi, l-adrenali, it-testi, l-*epididymides*, l-*ovaries,* l-utru, it-*thyroid* (bil- *parathyroids*) it-*thymus*, il-milsa, il-moħħ u l-qalb ta' l-annimali kollha (ħlief ta' dawk li jkunu qed imutu u/jew jiġu maqtula) għandhom jiġu trimmjati minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u għandhom ikunu mwieżna niedja malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex ma jinxfux.

▼B

It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni ħistopatoloġika maħsuba sussegwenti: il-feriti kbar kollha, il-moħħ (partijiet rappreżentattivi inklużi iċ-ċerebrum, iċ-ċerebelllum u l-*medulla/-pons*), il-korda spinali (fi tliet livelli: ċervikali, *mid-thoracic* u *lumbar*) il-glandoli tal-*pituitary,* l-għajnejn, il-glandoli tat-*thyroid,* tal-*parathyroid,* tat-*thymus,* ta l-*oesophagus,* u dawk *salivary*, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inklużi l- *Peyer's patches*), il-fwied, il-*gall bladder,* il-frixa, kliewi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-trakea u l-pulmuni, l-aorta, il-*gonads*, l-utru, l-organi sesswali aċċessorili, il-glandola mammarja femminili, il-prostata, il-bużżieqa ta' l-urina, in-noduli limfatiċi (preferibbilment nodulu limfatiku wieħed li jkopri r-rotta ta' l-amministrazzjoni u oħra distanti mir-rotta ta' l-amministrazzjoni biex tkopri l-effetti sistematiċi), in-nerv periferali (*sciatic* jew *tibial*) preferebbilment viċin il-muskolu, u biċċa mill-mudullun (u/jew, *a fresh bone marrow aspirate*) u l-ġilda. Is-sejbiet klinikali u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu li hemm bżonn jiġu eżaminati tessuti addizzjonali. Kwalunkwe organi li jistgħu jkunu organi-mira bbażati fuq il-proprjetajiet magħrufa tas-sustanza tat-test għandhom jiġu ppreservati.

1.5.5.4. *Il-ħispatoloġija*

Il-ħispatoloġija kompluta għandha titwettaq fuq l-organi u t-tessuti ppreservati ta'għallinqas l-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doża għolja. L-eżaminazzjoni għandha tiġi estiża għall-annimali tal-gruppi ta' dożaġġ l-oħra, jekk it-tibdil relatat mat-trattament jiġi osservat fil-grupp ta' doża għolja.

Il-feriti grossi kollha għandhom jiġu eżaminati

Meta jintuża grupp satellita il-ħistopatoloġija għandha ssir fuq it-tessuti u l-organi identifikati bħala li qed juru l-effetti fil-gruppi trattati.

2. DATA U RAPPORTAĠĠ

2.1. DATA

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li nstabu mejta waqt it-test jew li nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kwalunkwe mewt jew qtil uman, in-numru li juri sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż il-ħin ta' l-*onset*, it-tul, il-qawwa ta' kwalunkwe effetti tossiċi, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, it-tip ta' feriti u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip ta' ferita.

Meta huwa applikabbli, ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' statistika xieraq u ġeneralment aċċettat. Il-metodi statistiċi u d-data li trid tiġi analizzata għandha tingħażel waqt id-disinn ta' l-istudju.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼B

2.2.1. **Is-sustanza għat-test:**

— In-natura fiżika, il-purità u il-proprjetajiet fiżiko-kemikali;

— Id-data ta' identifikazzjoni;

— Il-mezz (jekk inhu xieraq): il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz, jekk mhuwiex l-ilma.

2.2.2. **L-ispeċi għat-test:**

— l-ispeċi/is-silta użati;

— In-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— Is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, id-dieta eċċ.;

— Il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

2.2.3. **Il-kundizzjonijiet għat-test:**

— Ir-*rationale* għall-għażla tal-livell tad-doża;

— Id-dettalji tat-tħejjija tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza għat-test, il-konċentrazzjoni; miksuba u l-omoġeneità tat-tħejjija;

— id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— Id-dożi kif inhuma tabilħaqq (mg/kg piż tal-ġisem/jum), u l-fattur tal-konverżjoni mill-konċentrazzjoni tat-test għas-sustanza tad-dieta/l-ilma għax-xorb (ppm) għad-doża kif inhi tabilħaqq, jekk applikabbli;

— Id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma.

2.2.4. **Ir-riżultati:**

— Il-piż tal-ġisem/it-tibdil fil-piż tal-ġisem;

— Il-konsum ta' l-ikel u ta' l-ilma jekk applikabbli;

— Id-data tar-rispons tossiku bis-sess u bil-livell tad-doża, inklużi s-sinjali tat-tossiċità;

— In-natura, il-qawwa u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (jekk humiex riversibbli jew le);

— L-eżaminazzjoni oftalmoloġika;

— it-testijiet ematoloġiċi bil-valuri *base-line* relevanti;

— it-testijiet tal-bijokemistrija klinika bil-valuri *base-line* relevanti;

— il-piż tal-ġisem terminali, il-piżijiet ta' l-organi u r-*ratios* tal-piż ta' l-organi u tal-ġisem;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet ħistopatoloġiċi kollha;

— Id-data ta' l-assorbiment jekk hi disponibbli;

— trattament statistiku tar-riżultati, fejn hu xieraq;

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet.

▼B

B.28. **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 perjodu ta' 90 ġurnata. Matul dan il-perjodu 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 kundizzjonijiet ta' sistemazzjoni u għalf esperimentali għal mill-inqas ħamest ijiem qabel it-test. Qabel it-test annimali żgħar u b'saħħithom huma maghżulin 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 kunsiderazzjoni 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.

Kundizzjonijiet 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.

▼B

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-perjodu t'espożizzjoni 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, fatal-itajiet. L-inqas livell ta' doża m'għandux jipproduċi xi evidenza ta' tossiċità. Fejn hemm estimazzjoni użabbli ta' espożizzjoni 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' espożizzjoni 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.

▼B

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 perjodu 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-espożizzjoni għandu jkun ta' sitt siegħat 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-espożizzjoni 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-perjodu ta' l-espożizzjoni, 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-perjodu 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-espożizzjoni 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-perjodu tat-test.

▼B

(ċ) Determinazzjoni tal-bijokimika tal-klinika fuq id-demm għandha tkun magħmula fit-terminu tal-perjodu 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'perjodu ta' sawm addattat għall-ispeċi), transaminat tas-serkum glutamiku pirviku [6], transaminat tas-serum glutamiku ożaloċetiku [7], 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 kunsiderazzjoni 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 ġossinsla 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.

▼B

(ċ) 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.

3. **RAPPORTAĠĠ**

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-kundizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta;

— il-kundizzjonijiet 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;

▼B

— 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.

▼M4

B.29. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI SUBKRONIKA: STUDJU TA' 90 JUM

SOMMARJU

Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.29 rivedut tfassal biex jikkaratterizza b'mod sħiħ it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni għal durata subkronika (90 jum), u biex jipprovdi dejta robusta għall-valutazzjonijiet tar-riskju ta' inalazzjoni kwantitattiva. Gruppi ta' 10 rodituri rġiel u 10 nisa jkunu esposti 6 sigħat kuljum matul perjodu ta' 90 jum (13-il ġimgħa) għal a) il-kimika għall-ittestjar fi tliet livelli jew aktar ta' konċentrazzjoni, b) l-arja ffiltrata (kontroll negattiv), u/jew c) il-vejjikolu (kontroll ta' vejjikolu). L-annimali jkunu esposti ġeneralment għal 5 ijiem fil-ġimgħa iżda l-espożizzjoni għal 7 ijiem fil-ġimgħa hija wkoll permessa. L-iġiel u nisa jkunu dejjem ittestjati, iżda jkunu jistgħu jiġu esposti f'livelli differenti ta' konċentrazzjoni jekk ikun magħruf li sess wieħed ikun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar. Dan il-metodu jippermetti lid-direttur tal-istudju jkun flessibbli biex jinkludi gruppi satellitarji (riversibbli), qatliet interim, ħasil tal-bronkoalveolari (BAL), testijiet newroloġiċi u patoloġija klinika addizzjonali u evalwazzjonijiet istopatoliġiċi biex it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar tkun ikkaratterizzata aħjar.

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test 413 (2009) tal-OECD. Il-Linja Gwida tat-Test 413 (TG 413) oriġinali dwar inalazzjoni subkronika kienet adottata fl-1981 (1). Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.29 (bħala ekwivalenti għat-TG 413 (2009) riveduta) kien aġġornat biex jirrifletti l-istat tax-xjenza u biex jissodisfa ħtiġijiet regolatorji preżenti u futuri.

2. Studji dwar tossiċità ta' inalazzjoni subkronika jintużaw primarjament biex ikunu dderivati konċentrazzjonijiet regolatorji għall-valutazzjoni tar-riskju ta' ħadddiema f'konfigurazzjonijiet okkupazjonali. Jintużaw ukoll biex ikun ivvalutat riskju residenzjali, ta' trasport u ambjentali għall-bniedem. Dan il-metodu jgħin biex ikunu kkaratterizzati effetti ħżiena wara espożizzjoni ripetuta kuljum ta' inalazzjoni għal kimika għall-ittestjar għal 90 jum (madwar 10 % tal-ħajja kollha ta' far). Id-dejta derivata minn studji dwar tossiċità ta' inalazzjoni subkronika tista' tintuża għal valutazzjonijiet tar-riskji kwantitattivi u għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet għal studji kroniċi. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux maħsub speċifikatament għall-ittestjar tan-nanomaterjali. Id-definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma pprovduti fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida (GD) 39 (2).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

3. L-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju biex tissaħħaħ il-kwalità tal-istudju u biex l-użu tal-annimali jkun minimizzat. L-informazzjoni li għandha tassisti fl-għażla ta' konċentrazzjonijiet ta' testijiet adatti tista' tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli u dejta tossikoloġika dwar kimiċi relatati strutturalment; u dejta derivata minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjoni. Jekk tkun mistennija jew osservata newrotossiċità waqt li jkun għaddej l-istudju, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jinkludi evalwazzjonijiet xierqa bħal gaġġa funzjonali ta' osservazzjoni (FOB) u kejl ta' attività motorja. Għalkemm l-għażla sewwa tal-ħin ta' espożizzjonijiet relattivi għal eżamijiet speċifiċi tista' tkun kritika, il-prestazzjoni ta' dawn l-attivitajiet addizzjonali m'għandhiex tfixkel id-disinn bażiku tal-istudju.

▼M4

4. Dilwizzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar korrużivi jew irritanti jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet li għandhom irendu l-grad mixtieq ta' tossiċità. Jekk jogħġbok irreferi għal GD 39 (2) għal aktar informazzjoni. Meta l-annimali jkunu esposti għal dawn il-materjali, il-konċentrazzjonijiet immirati għandhom ikunu baxxi biżżejjed li ma joħolqux uġigħ kbir u diffikultà, iżda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta' konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilħqu l-għan regolatorju u xjentifiku tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jintgħażlu abbażi ta' każ każ, preferibbilment imsejsa fuq studju mfassal b'mod adegwat ta' detezzjoni ta' firxa li jipprovdi informazzjoni dwar il-punt ta' tmiem kritiku, dwar kull limitu ta' irritazzjoni u dwar il-ħin ta' meta beda (ara l-paragrafi 11-13). Għandha tingħata l-ġustifikazzjoni għal għażla tal-konċentrazzjoni.

5. L-annimali moribondi jew annimali li jkunu jidhru li jkunu muġugħa jew li juru sinjali ta' diffikultà severa u fit-tul għandhom jinqatlu b'mod uman. L-annimali moribondi jitqiesu bl-istess mod bħal annimali li jmutu waqt it-test. Il-kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni li jinqatlu annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu ħafna, u l-gwida biex ikun magħruf meta l-mewt tkun tista' titbassar jew tkun waslet qrib ħafna, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' Speċi tal-Annimali

6. Għandhom jintużaw rodituri adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi preferuta hija l-far. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw speċijiet oħra.

Preparazzjoni tal-Annimali

7. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal. Fil-jum li fih jintgħażlu b'mod każwali, l-annimali għandhom ikunu adulti żgħażagħ li jkunu minn 7 sa 9 ġimgħat fl-età. Il-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' ±20 % tal-piż medju għal kull sess. L-annimali jintgħażlu b'mod każwali, jiġu mmarkati għal identifikazzjoni individwali, u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 ijiem qabel ma jibda t-test biex jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Trobbija tal-Annimali

8. L-annimali għandhom ikunu identifikati individwalment, preferibbilment bi transponders taħt il-ġilda, biex ikunu ffaċilitati l-osservazzjonijiet u tkun evitata l-konfużjoni. It-temperatura tal-kamra ta' manutenzjoni tal-annimali esperimentali għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara l-espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-għadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull annimal u għandu jimminimizza t-telf minħabba kannibaliżmu u ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieħer biss, jista' jkun jeħtiġilhom jidraw it-tubi ta' trażżin. It-tubi ta' trażżin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusklu. Jekk tkun disponibbli dejta ġenerika li turi li ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa ċertu limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx meħtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trażżin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jitħallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' xħabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, ħlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

▼M4

Kmamar tal-Inalazzjoni

9. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-oġġett tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-modalità ppreferuta ta' espożizzjoni hija mill-imnieħer biss (liema fraži tinkludi r-ras biss, l-imnieħer biss, jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieħer biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu aħjar billi tintuża modalità ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu, iżda dan għandu jkun iġġustifikat fir-rapport tal-istudju. Biex tkun żgurata stabbiltà tal-atmosfera meta tintuża kamra għall-ġisem kollu, il-volum totali tal-annimali tat-test m'għandux ikun aktar minn 5 % tal-volum tal-kamra. Il-prinċipji tat-tekniki tal-espożizzjoni mill-imnieħer biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma indirizzati f'GD 39 (2).

STUDJI DWAR IT-TOSSIĊITÀ

Konċentrazzjonijiet Limitati

10. B'differenza minn studji akuti, m'hemmx konċentrazzjonijiet ta' limitu ddefiniti fi studji dwar it-tossiċità ta' inalazzjoni subkronika. Il-konċentrazzjoni massima ttestjata għandha tqis: 1) il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb, 2) il-livell ta' "l-agħar każ" ta' espożizzjoni umana, 3) il-ħtieġa li tinżamm provvista adegwata ta' ossiġenu, u/jew 4) konsiderazzjonijiet ta' trattament xieraq tal-annimali. Fin-nuqqas ta' limiti abbażi ta' dejta, jistgħu jintużaw il-limiti akuti tar-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (13) (jiġifieri, sa konċentrazzjoni massima ta' 5 mg/l għal aerosols, 20 mg/l għal fwar u 20 000 ppm għal gassijiet); irreferi għal GD 39 (2). Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk ikun meħtieġ li dawk il-limiti jinqabżu meta jkunu ttestjati gassijiet jew kimiċi għall-ittestjar volatili ħafna (eż. refriġeranti). Il-konċentrazzjoni limitata għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolqot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

Studju dwar id-Detezzjoni ta' Firxa

11. Qabel ma jingħata bidu għall-istudju ewlieni, ġeneralment ikun meħtieġ li jsir studju dwar id-detezzjoni ta' firxa. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa huwa aktar komprensiv minn studju ta' osservazzjoni minħabba li mhux limitat għal għażla ta' konċentrazzjonijiet. It-tagħlim li hemm x'wieħed jieħu minn studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jwassal biex studju ewlieni jirnexxi. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista', pereżempju, jipprovdi informazzjoni teknika dwar metodi analitiċi, teħid tad-daqs tal-partiċelli, sejbien ta' mekkaniżmi tossiċi, patoloġija klinika u dejta istopatoloġika u stimi ta' x'jistgħu ikunu konċentrazzjonijiet NOAEL u MTC fi studju ewlieni. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża l-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa biex jidentifika l-limitu ta' irritazzjoni tas-sistema respiratorja (eż. b'istopatoloġija tas-sistema respiratorja, l-ittestjar tal-funzjoni pulmonarja jew il-ħasil tal-bronkoalveolari), il-konċentrazzjoni ogħla li hija tollerata mingħajr tensjoni bla bżonn għall-annimali u l-parametri li għandhom jikkaratterizzaw bl-aħjar mod it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar.

12. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jikkonsisti f'livell wieħed jew aktar ta' konċentrazzjonijiet. Skont il-punti ta' tmiem magħżulin, għandhom ikunu esposti minn tlieta sa sitt irġiel u minn tlieta sa sitt nisa f'kull livell ta' konċentrazzjoni. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa għandu jdum mill-anqas 5 ijiem u ġeneralment mhux aktar minn 28 jum. Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet għall-istudju ewlieni għandu jingħata fir-rapport ta' studju. L-għan tal-istudju ewlieni huwa li tintwera relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons ibbażata fuq dak li huwa mistenni li jkun l-aktar punt ta' tmiem sensittiv. Il-konċentrazzjoni baxxa għandha idealment tkun konċentrazzjoni ta' ebda effett ħażin osservat, filwaqt li l-konċentrazzjoni għolja għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolqot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

▼M4

13. Meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni għall-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa, l-informazzjoni kollha disponibbli għandha titqies li tinkludi relazzjonijiet ta' attività strutturata u dejta għal kimiċi simili (ara l-paragrafu 3). Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jivverifika/jirrifjuta dawk li jitqiesu li jkunu l-punti ta' tmiem l-aktar sensittivi bbażati b'mod mekkaniku, eż. inibizzjoni ta' kolinesteraži b'organofosfati, formazzjoni ta' metemoglobina b'aġenti eritroċitotossiċi, ormoni tat-tirojde (T3, T4) għal tirotossikanti, proteina, LDH jew newtrofili f'ħasil tal-bronkoalveolari għal partiċelli li ftit jinħallu li ma jagħmlux ħsara jew aerosols li jirritaw il-pulmun.

Studju ewlieni

14. L-istudju subkroniku ewlieni dwar tossiċità ġeneralment jikkonsisti fi tliet livelli ta' konċentrazzjoni, u wkoll kontrolli konkurrenti negattivi (arja) u/jew ta' vejjikoli skont il-ħtieġa (ara l-paragrafu 18). Id-dejta kollha disponibbli għandha tkun utilizzata bħala għajnuna fl-għażla ta' livelli adatti ta' espożizzjoni, inklużi r-riżultati ta' studji sistemiċi ta' tossiċità, metaboliżmu u kinetika (għandha ssir enfaži partikolari biex ikunu evitati livelli għoljin ta' konċentrazzjoni li jissaturaw proċessi kinetiċi). Kull grupp ta' test ikollu fih 10 rodituri rġiel u 10 nisa li jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar għal 6 sigħat kuljum fuq bażi ta' 5 ijiem fil-ġimgħa għal perjodu ta' 13-il ġimgħa (l-eżami jdum b'kollox mill-anqas 90 jum). L-annimali jistgħu wkoll ikunu esposti 7 ijiem fil-ġimgħa (eż. meta l-ittestjar ikun ħa l-farmaċewtiċi man-nifs). Jekk ikun magħruf li wieħed miż-żewġ sessi jkun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar, is-sessi jkunu jistgħu jiġu esposti f'livelli differenti ta' konċentrazzjoni biex isir l-aħjar użu mill-konċentrazzjoni-rispons kif deskritt fil-paragrafu 15. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta l-espożizzjoni ddum anqas minn 6 sigħat/jum, jew meta jkun meħtieġ li jsir studju ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu li jdum aktar (eż. 22 siegħa/jum) (irreferi għal GD 39) (2). M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzzjoni sakemm espożizzjoni ma ddumx aktar minn 6 sigħat. Jista' jingħata l-ilma matul l-espożizzjoni kollha mill-ġisem kollu.

15. Il-konċentrazzjonijiet immirati magħżulin għandhom jidentifikaw l-organu/i mmirat(i) u juru konċentrazzjoni-rispons ċari:

— Il-livell għoli ta' konċentrazzjoni għandu jirriżulta f'effetti tossiċi iżda m'għandux jikkawża sinjali jew letalità li jdumu u li ma jħallux li ssir evalwazzjoni li tagħmel sens.

— Il-livell(i) intermedju/i ta' konċentrazzjoni għandhom ikunu spazjati biex jipproduċu gradazzjoni ta' effetti tossiċi bejn dawk tal-konċentrazzjoni baxxa u dawk tal-konċentrazzjoni għolja.

— Il-livell baxx ta' konċentrazzjoni għandu jipproduċi ftit jew ebda evidenza ta' tossiċità.

Qatliet Interim

16. Jekk ikunu ppjanati qatliet interim, l-għadd ta' annimali f'kull livell ta' konċentrazzjoni għandu jiżdied bl-għadd li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Għandu jingħata l-motiv għal użu ta' qatliet interim, u analiżi ta' statistika għandha tagħti spjegazzjoni sewwa tagħhom.

▼M4

Studju Satellitarju (Riversibbiltà)

17. Studju satellitarju (riversibbiltà) jista' jintuża biex ikunu osservati r-riversibbiltà, il-persistenza jew l-okkorrenza mdewma ta' tossiċità għal perjodu ta' wara trattament ta' tul xieraq, iżda ta' mhux anqas minn 14-il jum. Gruppi satellitarji (riversibbli) jikkonsistu f'10 rġiel u 10 nisa esposti kontemporanjament mal-annimali tal-esperiment fl-istudju ewlieni. Gruppi ta' studju satellitarju (riversibbli) għandhom ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar fl-ogħla livell ta' konċentrazzjoni u għandu jkun hemm arja konkurrenti u/jew kontrolli ta' vejjikoli skont il-ħtieġa (ara l-paragrafu 18).

Annimali tal-Kontroll

18. L-annimali tal-kontroll negattiv (arja) konkurrenti għandhom ikunu mmaniġġati b'mod identiku għall-grupp ta' annimali tat-test ħlief li huma jkunu esposti għal arja filtrata milli għal kimika għall-ittestjar. Meta l-ilma jew sustanza oħra jintużaw biex jassistu biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test, fl-istudju għandu jkun inkluż grupp ta' kontroll ta' vejjikoli, minflok grupp ta' kontroll negattiv (arja). Kull meta jkun possibbli għandu jintuża l-ilma bħala l-vejjikolu. Meta l-ilma jintuża bħala l-vejjikolu, l-annimali ta' kontroll għandhom ikunu esposti għal arja bl-istess umdità relattiva bħal tal-gruppi esposti. L-għażla ta' vejjikolu adattat għandha tkun ibbażata fuq studju minn qabel immexxi sewwa jew fuq dejta storika. Jekk it-tossiċità ta' vejjikolu ma' tkunx magħrufa sewwa, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li juża kemm kontroll negattiv (arja), kif ukoll kontroll ta' vejjikolu, iżda dan għandu jkun skuraġġit ħafna Jekk dejta storika turi li vejjikolu ma jkunx tossiku, f'dak il-każ ma jkunx hemm ħtieġa għal grupp ta' kontroll negattiv (arja) u għandu jintuża biss kontroll tal-vejjikolu. Jekk studju minn qabel ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma turi ebda tossiċità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata u għandu jintuża dan il-kontroll ta' vejjikolu.

KONDIZZJONIJIET TAL-ESPOŻIZZJONI

Amministrazzjoni tal-Konċentrazzjonijiet

19. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew taħlita tagħhom. L-istat fiżiku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mill-konċentrazzjonijiet magħżulin, u/jew mill-forma fiżika li x'aktarx ħafna jkun hemm matul it-trattament u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet esplussivi. Il-materjal tal-partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli. Gwida ulterjuri hija pprovduta f'GD 39 (2).

Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Partiċelli

20. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex titħalla jkun hemm espożizzjoni tar-reġjuni kollha rilevanti tas-sistema respiratorja, huma rrakkomandati aerosols b'dijametri ajrudinamiċi ta' medjan tal-massa (MMAD) f'firxa minn 1 sa 3 μm b'devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g) fil-firxa ta' 1,5 sa 3,0 (4). Għalkemm għandu jsir sforz raġonevoli biex dan l-istandard jintlaħaq, għandu jkun ipprovdut ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, partiċelli ta' dħaħen tal-metall ikunu iżgħar minn dan l-istandard, u partiċelli u fibri ċċarġjati tad-dħaħen tal-metall jistgħu jaqbżuh.

▼M4

Preparazzjoni tal-Kimika għall-Ittestjar f'Vejjikolu

21. Idealment, il-kimika għall-ittestjar għandha tiġi ttestjata mingħajr vejjikolu. Jekk ikun meħtieġ jintuża vejjikolu biex ikunu ġġenerati l-konċentrazzjoni adattata tal-kimika għall-ittestjar u d-daqs tal-partiċelli, l-ilma għandu jingħata preferenza. Kull darba li kimika għall-ittestjar tinħall f'vejjikolu, l-istabbiltà tagħha għandha tintwera.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Fluss tal-Arja fil-Kamra

22. Il-fluss tal-arja mal-kamra ta' espożizzjoni għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u rreġistrat mill-anqas kull siegħa matul kull espożizzjoni. Il-monitoraġġ f'ħin reali tat-konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà temporali) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdi mezzi indiretti għall-kontroll tal-parametri rilevanti u dinamiċi kollha tal-inalazzjoni. Jekk il-konċentrazzjoni tkun immonitorjata f'ħin reali, il-frekwenza tal-kejl ta' flussi ta' arja tista' titnaqqas sa kejl wieħed għal kull espożizzjoni għal kull jum. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex ikun evitat teħid mill-ġdid ta' nifs fil-kmamar għall-imnieħer biss. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u l-konċentrazzjoni ta' dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wieħed jemmen li dan l-istandard ma jkunx jista' jitlaħaq, il-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu u tad-dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu. Jekk il-kejlijiet fl-ewwel jum ta' espożizzjoni juru li dawn il-gassijiet ikunu ta' livelli tajbin, ma jkunux meħtieġa aktar kejlijiet.

Temperatura tal-Kamra u Umdità Relattiva

23. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm għal 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieħer biss, kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata kontinwament u rreġistrata kull siegħa matul kull espożizzjoni meta jkun possibbli. L-umdità relattiva għandha preferibbilment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati taħlitiet abbażi ta' ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minħabba interferenza minn kimika għall-ittestjar mal-Metodu ta' Ttestjar.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni Nominali

24. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominal tal-kamra tal-espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda hija paragun tal-konċentrazzjoni nominali u l-konċentrazzjoni attwali tagħti indikazzjoni tal-effiċjenza ta' ġenerazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, tista' tintuża biex jinkixfu problemi ta' ġenerazzjoni.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni attwali

25. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar kif ikun itteħdilha l-kampjun tagħha fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu jew b'metodi speċifiċi (eż. teħid dirett ta' kampjuni, metodi ta' assorbiment jew kimiċi reattivi u karatterizzazzjoni analitika sussegwenti) jew b'metodi mhux speċifiċi bħal analiżi gravimetrika b'filtru. L-użu ta' analiżi gravimetrika huwa aċċettabbli biss għal aerosols tat-trab b'komponent wieħed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilità baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għall-kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'ħafna

▼M4

komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analiżi gravimetrika. Iżda din teħtieġ dejta analitika li turi li l-kompożizzjoni ta' materjal tal-ajru tkun simili għall-materjal tal-bidu. Jekk din l-informazzjoni ma tkunx disponibbli, tista' tkun meħtieġa analiżi mill-ġdid tal-kimika għall-ittestjar (idealment fl-istat tagħha fl-arja) f'intervalli regolari waqt li jkun għaddej l-istudju. Għal aġenti aerosolizzati li jistgħu jevaporaw jew jissubblimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu nġabru bil-metodu magħżul.

26. Għandu jintuża lott wieħed tal-kimika għall-ittestjar sakemm idum l-istudju, jekk ikun possibbli, u l-kampjun tat-test għandu jinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-purezza, l-omoġeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbeda l-istudju, għandu jkun hemm karatterizzazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkluża l-purezza tagħha, u jekk teknikament fattibbli, l-identità u l-kwantitajiet ta' kontaminanti u impuritajiet identifikati. Dan jista' jintwera bid-dejta li ġejja, iżda ma jkunx limitat għaliha: ħin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimi oħra. Għalkemm l-identità tal-kampjun tat-test mhix ir-responsabbiltà tal-laboratorju tat-test, ikun prudenti għal-laboratorju tat-test li jikkonferma l-karatterizzazzjoni tal-isponser mill-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

27. L-atmosfera ta' espożizzjoni għandha tinżamm kostanti daqs kemm ikun prattikabbli. Jista' jintuża apparat ta' monitoraġġ f'ħin reali, bħal fotomiter tal-aerosol għal aerosols jew analizzatur ta' idrokarbur totali għal fwar biex tintwera l-istabbiltà tal-kundizzjonijiet ta' espożizzjoni. Konċentrazzjoni attwali tal-kamra għandha titkejjel mill-anqas 3 darbiet matul kull jum ta' espożizzjoni għal kull livell ta' konċentrazzjoni. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minħabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew minħabba konċentrazzjonijiet baxxi, kampjun wieħed għal kull perjodu ta' espożizzjoni jkun aċċettabbli. Idealment, dan il-kampjun għandu mbagħad jinġabar tul il-perjodu kollu ta' espożizzjoni. Il-kampjuni individwali tal-konċentrazzjoni tal-kamra jistgħu jkollhom devjazzjoni mill-konċentrazzjoni medja tal-kamra b'mhux aktar minn ± 10 % għall-gassijiet u l-fwar, u b'mhux aktar minn ± 20 % għall-aerosols likwidi jew solidi. Il-ħin biex tinkiseb ekwilibrazzjoni tal-kamra (t_{95}) għandu jkun ikkalkulat u rrappurtat. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-ħin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata. Din tqis il-ħinijiet meħtieġa biex jinkisbu l-ekwilibrazzjoni (t_{95}) u d-degradazzjoni tal-kamra. Gwida għal stima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (2).

28. Għal taħlitiet kumplessi ħafna li jikkonsistu f'gassijiet/fwar u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodotti/mezzi ta' użu finali b'għan speċifiku), kull fażi tista' taġixxi b'mod differenti f'kamra tal-inalazzjoni. Għalhekk għandha tintgħażel mill-anqas sustanza indikatriċi waħda (analita), normalment l-ingredjent prinċipali attiv fit-taħlita, ta' kull fażi (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun taħlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-taħlita totali, u mhux biss għall-ingredjent attiv jew għas-sustanza indikatriċi (analita). Informazzjoni addizzjonali dwar il-konċentrazzjonijiet attwali tinsab f'GD 39 (2).

Kimika għall-Ittestjar: Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Partiċelli

29. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas kull ġimgħa għal kull livell ta' konċentrazzjoni billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv bħall-għodda ajrudinamika li tagħti d-daqs tal-partiċelli (APS). Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza tar-riżultati miksubin minn impattur kaskata u mill-istrument alternattiv, f'dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista' jintuża tul l-istudju kollu.

▼M4

30. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża flimkien mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-ġabra. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi tad-daqs ta' partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi b'filtru [ara GD 39 (2)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-konċentrazzjonijiet kollha ttestjati fil-fażi bikrija tal-istudju, f'dak il-każ il-kejlijiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jitħallew barra. Biex jinżamm trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista' twassal għal ħtieġa ta' ripetizzjoni ta' studju.

31. It-teħid tad-daqs ta' partiċelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista' tirriżulta kondensazzjoni ta' fwar fil-formazzjoni ta' aerosol, jew jekk jinstabu partiċelli f'atmosfera ta' fwar b'potenzjal għal fażijiet imħallta.

OSSERVAZZJONIJIET

32. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament qabel, matul, u wara l-perjodu ta' espożizzzjoni. Jistgħu jkunu indikati osservazzjonijet aktar ta' spiss skont ir-rispons tal-annimali matul espożizzjoni. Meta l-osservazzjoni tal-annimali tkun imfixkla bl-użu ta' tubi ta' trażżin tal-annimali, bi kmamar għall-ġisem kollu mixgħulin ħażin, jew b'atmosferi opaki, l-annimali għandhom ikunu osservati bir-reqqa wara l-espożizzjoni. L-osservazzjonijiet qabel l-espożizzjoni tal-jum li jkun imiss tista' tivvaluta kull riversibbiltà jew effetti tossiċi li jkunu marru aktar għall-agħar.

33. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'reġistri individwali miżmumin għal kull annimal. Meta annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.

34. Osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludi bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn, il-membrani mukuża; bidliet fis-sistema respiratorja u ċirkulatorja; bidliet fis-sistema nervuża; u bidliet f'attività somatomotorja u xejriet ta' mġiba. L-attenzjoni għandha tkun diretta għal osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulżjonijiet, tbeżliq, dijarea, letarġija, rqad u koma. Il-kejl tat-temparaturi tar-rektum jista' jipprovdi evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ipo/ipertermja relatati mat-trattament jew l-għeluq. Valutazzjonijiet addizzjonali jistgħu jkunu inklużi fil-protokoll ta' studju bħal kinetika, monitoraġġ bijoloġiku, funzjoni tal-pulmun, ritenzjoni ta' materjali li ftit jinħallu li jinġemgħu fit-tessut tal-pulmun u bidliet ta' mġiba.

PIŻIJIET TAL-ĠISEM

35. Il-piżijiet tal-annimali indivdwali għandhom jiġu rreġistrati ftit qabel l-ewwel espożizzjoni (jum 0), u darbtejn fil-ġimgħa wara din (pereżempju: nhar ta' Ġimgħa u nhar ta' Tnejn biex juru l-irkupru matul tmiem il-ġimgħa mingħajr espożizzjoni jew matul intervall tal-ħin biex jippermetti valuazzjoni tat-tossiċità sistematika) jew fil-mument tal-mewt jew l-ewtanażja. Jekk ma jkunx hemm effetti fl-ewwel 4 ġimgħat, il-piżijiet tal-ġisem jistgħu jitkejlu kull ġimgħa għall-bqija tal-istudju. L-annimali satellitarji (riversibbli) (jekk użati) għandhom jibqgħu jintiżnu kull ġimgħa tul il-perjodu kollu ta' rkupru. Fi tmiem l-istudju, l-annimali kollha għandhom jintiżnu ftit qabel il-qatla biex titħalla ssir kalkulazzjoni imparzjali ta' proporzjonijiet ta' organi ma' piżijiet tal-ġisem.

KONSUM TA' IKEL U ILMA

36. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel kull ġimgħa. Il-konsum tal-ilma wkoll jista' jitkejjel.

▼M4

PATOLOĠIJA KLINIKA

37. Valutazzjonijiet ta' patoloġija klinika għandhom isiru għall-annimali kollha, inklużi annimali ta' kontrolli u satellitarji (riversibbli), meta jinqatlu. L-intervall ta' ħin bejn tmiem espożizzjoni u ġbir ta' demm għandu jiġi rreġistrat, l-aktar meta l-kostituzzjoni mill-ġdid tal-punt ta' tmiem indirizzat tkun mgħaġġla. It-teħid ta' kampjuni wara tmiem espożizzjoni huwa indikat għal dawk il-parametri b'nofs ħajja plażmatika qasira (eż. COHb, CHE, u MetHb).

38. It-Tabella 1 telenka l-parametri ta' patoloġija klinika li ġeneralment ikunu meħtieġa għall-istudji tossikoloġiċi kollha. L-analiżi tal-awrina ma tkunx meħtieġa abbażi ta' rutina, iżda tista' ssir meta titqies utli bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jivvaluta parametri addizzjonali biex jikkaratterizza aħjar it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar (eż. kolinesteraži, lipidi, ormoni, bilanċ ta' aċidu/baži, metemoglobina jew korpi ta' Heinz, kinaži tal-kreatina, proporzjon ta' mjelojde/eritrojde, troponini, gassijiet ta' demm arterjali, deidroġenaži lattat, sorbital deidroġenaži, glutamat ta' deidroġenaži u gamma glutamil transpeptidaži).

Tabella 1

Parametri Standard ta' Patoloġija Klinika

Ematoloġija	
Għadd ta' eritroċiti	Għadd totali ta' lewkoċiti
Ematokrit	Għadd differenzjali ta' lewkoċiti
Konċentrazzjoni ta' emoglobina	Għadd ta' pjastrini
Emoglobina korpuskulari medja	Potenzjal għal emboliżmu (agħżel wieħed):
Volum korpuskulari medju	
Konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja	— Ħin protrombin
	— Ħin ta' emboliżmu
Retikuloċiti	— Ħin tromboplastin parzjali
Kimika klinika	
Glukożju (*)	Aminotransferaži tal-alanina
Kolesterol totali	Aspartate aminotransferaži
Trigliċeridi	Fosfataži alkalina
Nitroġenu tal-urea tad-demm	Potassju
Bilirubina totali	Sodju
Kreatinina	Kalċju
Proteina totali	Fosforu
Albumina	Klorur
Globulina	
Analiżi tal-awrina (fakultattiva)	
Dehra (lewn u turbidità)	Proteina totali
Volum	Glukożju
Gravità speċifika jew ożmolalità	Demm/ċelluli tad-demm
pH	

(*) Minħabba li perjodu ta' sawm fit-tul jista' jintroduċi parzjalità fil-kejl tal-glukożju għall-annimali ttrattati ma' dawk ta' kontroll, id-direttur tal-istudju għandu jiddetermina jekk ikunx sewwa li jsajjem lill-annimali. Jekk jintuża perjodu ta' sawm, dan għandu jkun adattat għall-ispeċi użata; għall-far dan jista' jkun 16-il siegħa (sawm tul il-lejl). Id-determinazzjoni ta' glukożju għas-sawm tista' ssir wara sawm tul il-lejl matul l-aħħar ġimgħa ta' espożizzjoni, jew wara sawm tul il-lejl qabel awtopsja (f'dan l-aħħar każ flimkien mal-parametri patoloġiċi kliniċi l-oħra kollha).

▼**M4**

39. Meta jkun hemm evidenza li s-sistema respiratorja inferjuri (jiġifieri, l-alveoli) tkun is-sit primarju ta' depożizzjoni u ritenzjoni, f'dak il-każ il-ħasil tal-bronkoalveolari (BAL) jista' jkun it-teknika ta' għażla biex ikunu analizzati kwantitattivament parametri b'effett ta' doża abbażi ta' ipoteżi li jiffokaw fuq alveolitis, infjammazzjoni pulmonari, u fosfolipidożi. Dan jippermetti li jkunu investigati sewwa bidliet ta' doża-rispons u ta' perkors ta' żmien meta jkun hemm ħsara alveolari. Il-fluwidu BAL jista' jkun analizzat għal għedud totali u differenzjali ta' lewkoċiti, proteina totali u deidroġenaži lattat. Parametri oħra li jistgħu jitqiesu huma dawk li jindikaw ħsara liżosomali, fosfolipidożi, fibroži u infjammazzjoni irritanti jew allerġika li tista' tinkludi d-determinazzjoni ta' ċitokines/kejmokines proinfjammatorji. Il-kejlijiet BAL ġeneralment jikkumplimentaw ir-riżultati minn eżamijiet ta' istopatoloġija iżda ma jistgħux jeħdulhom posthom. Gwida dwar kif isir ħasil tal-pulmuni tinsab f'GD 39 (2).

EŻAMI OFTALMOLOĠIKU

40. Bl-użu ta' oftalmoskopju jew apparat ekwivalenti, eżamijiet oftalmoloġiċi tal-fundus, tal-medja refrattiva, tal-iris u tal-konġuntiva għandhom isiru għall-annimali kollha qabel l-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, u għal gruppi kollha ta' konċentrazzjoni għolja u ta' kontrolli fit-tmiem. Jekk jinstab li jkun hemm bidliet fl-għajnejn, l-annimali kollha fil-gruppi l-oħra għandhom ikunu eżaminati, inkluż il-grupp satellitarju (riversibbiltà).

PATOLOĠIJA MAKROSKOPIKA U PIŻIJIET TA' ORGANI

41. L-annimali kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jitneħħew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal żvinar sħiħ (jekk ikun jista' jsir) u għal awtopsja makroskopika. Il-ħin bejn it-tmiem tal-aħħar espożizzjoni ta' kull annimal u meta jinqatel għandu jiġi rreġistrat. Jekk ma tkunx tista' ssir awtopsja minnufih wara li jkun instab annimal mejjet, l-annimal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperatura baxxa biżżejjed biex tkun imminimizzata l-awtoliżi. L-awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopiċi kollha għandhom jiġu rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.

42. It-Tabella 2 telenka l-organi u t-tessuti li għandhom ikunu ppreservati f'midjum adattat matul awtopsja makroskopika għal eżami istopatoloġiku. Il-preservazzjoni tal-organi u tat-tessuti [mqegħdin flimkien] u ta' kull organu u tessut ieħor tkun fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. L-organi mitkubin b'**tipa grassa** għandhom jintraqmu u jintiżnu mxarbin malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni biex ikun evitat it-tnixxif. It-tirojde u l-epididimi għandhom jintiżnu biss jekk ikun meħtieġ minħabba li ċ-ċelloli mill-irqim jistgħu jfixklu l-evalwazzjoni istopatoloġika. It-tessuti u l-organi għandhom jitqiegħdu f'10 % ta' formalina newtralizzata jew f'fissattiv adattat ieħor malli ssir l-awtopsja, u mhux f'anqas minn 24-48 siegħa qabel l-irqim skont il-fissattiv li għandu jintuża.

▼M4

Tabella 2

Organi u Tessuti Ippreservati Matul Awtopsja Makroskopika

Adrenali	Esofagu
Aorta	[Basla tax-xamm]
Mudullun tal-għadam (u/jew aspirat frisk)	**Ovarji**
Moħħ (inklużi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/mežoċefalu)	Frixa
Il-musrana l-għamja	Paratirojdi
Il-musrana l-ħoxna	Nerv periferali (xjatiku jew tibjali, preferibbilment qrib muskolu)
Duwodenu	Pitwitarja
[**Epididimi**]	Prostata
[Għajnejn (retina, nerv ottiku) u tebqiet l-għajnejn]	Il-musrana d-dritta
Wirk u l-għadma tar-riġel	Glandoli tal-bżieq
Il-bużżieqa tal-marrara (fejn ikun hemm)	Bżieżaq seminali
[Glandoli ta' Harder]	Ġilda
Qalb	Nerv vertebrali (ċervikali, midtoraċiku u lumbari)
Ileu	**Milsa**
Jejunum	Sternu
Kliewi	Stonku
[Glandoli tad-dmugħ (straorbitali)]	Snien
Larinġi (3 livelli inkluża l-bażi tal-epiglotta)	**Testikoli**
Fwied	**Timu**
Pulmun (id-denduliet kollha f'livell wieħed, inklużi l-bronki ewlenin)	**Tirojdi**
Nodi limfatiċi mir-reġjun ilarju tal-pulmun, speċjalment għal kimiċi f'partiċelli għall-ittestjar li ftit jinħallu. Għal eżamijiet u/jew studji aktar fil-fond b'fokus immunoloġiku, jistgħu jitqiesu nodi limfatiċi addizzjonali, eż. dawk mir-reġjuni medjastinali, ċervikali/submandibulari u/jew awrikulari.	[Lsien]
Nodi limfatiċi (distali mill-portal ta' dħul)	Trakea (mill-anqas 2 livelli inklużi taqsima 1 longitudinali tul il-karina u taqsima 1 trasversali)
Glandola mammarja (mara)	[Ureteru]
Muskolu (koxxa)	[Uretra]
Tessuti nażofaringali (mill-anqas 4 livelli; 1 livell biex jinkludi l-kanal nażofaringali u t-Tessut Limfojde b'Assoċjazzjoni Nażali (NALT))	Bużżieqa tal-awrina
	Utru
	Organu mmirat
	Il-leżjonijiet u l-mases kollha kbar

▼M4

43. Il-pulmuni għandhom jitneħħew intatti, jintiżnu u jiddaħħlu b'fissattivi adatti bi pressjoni ta' 20-30 cm ta' ilma biex ikun żgurat li tinżamm l-istruttura tal-pulmuni (5). Għandhom jinġabru taqsimiet għad-denduliet kollha f'livell wieħed, inklużi l-bronki ewlenin, iżda jekk isir il-ħasil tal-pulmuni, id-dendula mhux maħsula għandha titqiegħed fit-taqsima bi tliet livelli (mhux taqsimiet tas-serje).

44. Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas 4 livelli tat tessuti nażofariġali, li wieħed minnhom għandu jinkludi l-kanal nażofariġali (5) (6) (7) (8) (9) biex jitħalla jsir eżami adegwat tal-epitelju mimli qxur, tranżizzjonali (respiratorju mhux vibrali), respiratorju (respiratorju vibrali) u tax-xamm, u tat-tessut limfatiku ta' tisfija (NALT) (10) (11). Għandhom ikunu eżaminati tliet livelli tal-lariġi, u wieħed minn dawn il-livelli għandu jinkludi l-bażi tal-epiglotta (12). Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas żewġ livelli tat-trakea, inkluża taqsima waħda longitudinali tul il-karina minn fejn il-bronki estrapulmonari jinqasmu fi tnejn u taqsima waħda trasversali.

ISTOPATOLOĠIJA

45. Evalwazzjoni istopatoloġika tal-organi u tat-tessuti kollha elenkati fit-Tabella 2 għandha ssir għall-gruppi ta' kontroll u ta' konċentrazzjoni għolja, u bħall-annimali kollha li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lis-sistema respiratorja, organi mmirati u leżjonijiet kbar. L-organi u t-tessuti li jkollhom leżjonijiet fil-grupp ta' konċentrazzjoni għolja għandhom ikunu eżaminati fil-gruppi kollha. Id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jagħmel evalwazzjonijiet istopatoliġiċi għal gruppi addizzjonali biex juri rispons ċar ta' konċentrazzjoni. Meta jintuża grupp satellitarju (riversibbli), għandha ssir evalwazzjoni istopatoloġika għat-tessuti u l-organi kollha identifikati bħala li jkunu juru effetti fil-gruppi ttrattati. Jekk ikun hemm għadd eċċessiv ta' mwiet bikrija jew problemi oħra fil-grupp ta' espożizzjoni għolja li jippreġudikaw is-sinifikat tad-dejta, il-konċentrazzjoni aktar baxxa li jkun imiss għandha tkun eżaminata istopatoloġikament. Għandu jsir sforz biex osservazzjonijiet gravi jitqabblu ma' sejbiet mikroskopiċi.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

46. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwali dwar il-piżijiet tal-ġisem, il-konsum ta' ikel, il-patoloġija klinika, il-patoloġija makroskopika, il-piżijiet tal-organi u l-istopatoloġija. Dejta dwar osservazzjonijiet kliniċi għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali użati, l-għadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali speċifiċi ta' tossiċità, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-ħin tal-mewt ta' kull annimal, deskrizzjoni u perkors ta' żmien ta' effetti tossiċi u riversibbiltà, u sejbiet minn awtopsji. Ir-riżultati kollha, kwantitattivi u inċidentali, għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika adattat. Jista' jintuża kull metodu ta' statistika ġeneralment aċċettat u l-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju.

Rapport tat-Test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skont il-każ:

Annimali tat-test u trobbija

— Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta.

▼M4

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far; Jistgħu jkunu pprovduti sors u dejta storika, jekk ikunu għal annimali esposti f'kundizzjonijiet simili ta' espożizzjoni, abitazzjoni u sawm.

— Għadd, età u sess tal-annimali.

— Metodu ta' każwalità.

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard.

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza, u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża isomerizzazzjoni).

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS), jekk ikunu magħrufa;

Vejjikolu

— Ġustifikazzjoni għal użu ta' vejjikolu u ġustifikazzjoni għal għażla tal-vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

— Dejta storika jew konkurrenti li turi li l-vejjikolu ma jfixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni dettaljata tal-kamra tal-inalazzjoni inkluż volum u dijagramma.

— Sors u deskrizzjoni ta' tagħmir użati għall-espożizzjoni tal-annimali kif ukoll għall-ġenerazzjoni tal-atmosfera.

— Tagħmir għall-kejl tat-temperatura, umdità, daqs ta' partiċelli u konċentrazzjoni attwali;

— Sors ta' arja u sistema użata għal kondizzjonament.

— Metodi użati għall-kalibrazzjoni ta' tagħmir biex tkun żgurata atmosfera omoġenea tat-test.

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva).

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieħer biss); post tat-tqegħid tal-annimali fil-kamra (ġisem kollu).

— Stabbiltà tal-atmosfera tat-test.

— Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u teħid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;

— Trattament ta' arja pprovduta/estratta.

— Rati ta' fluss tal-arja, rata ta' fluss ta' arja/port ta' espożizzjoni (mnieħer biss), jew toqol tal-annimali/kamra (ġisem kollu).

— Ħin għall-ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t95).

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli).

Dejta tal-espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni.

▼M4

— Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal ġol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra).

— Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-żona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal taħlitiet li jipproduċu forom fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament.

— Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (mg/l mg/m^3, eċċ.) milli f'unitajiet ta' volum (ppm, ppb, eċċ.).

— Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli, dijametru ajrudinamiku ta' medjan tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Analiżi waħda għal kull daqs ta' partiċelli għandha tkun irrappurtata.

Kundizzjonijiet tat-test

— Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kwalunkwe proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs tal-partiċelli ta' materjali solidi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar.

— Deskrizzjoni (preferibbilment inkluża dijagramma) tat-tagħmir użat biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test u biex l-annimali jkunu esposti għall-atmosfera tat-test.

— Dettalji tat-tagħmir użat biex jimmonitorja t-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss ta' arja fil-kamra (jiġifieri żvilupp ta' kurva ta' kalibrazzjoni).

— Dettalji tat-tagħmir użat biex jinġabru kampjuni għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-kamra u d-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli.

— Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u tal-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-teħid tal-kampjuni);

— Metodu ta' każwalità fl-assenjazzjoni ta' annimali lil gruppi ta' ttestjar u ta' kontroll.

— Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inklużi tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma).

— Il-motiv għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test.

Riżultati

— Tabulazzjoni tat-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss tal-arja.

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' konċentrazzjoni nominali u attwali tal-kamra.

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar id-daqs tal-partiċelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli u kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g.

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar rispons u ta' livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri, annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, iż-żmien meta jfaqqgħu u durata tal-effetti).

▼M4

— Tabulazzjoni tal-piżijiet individwali ta' kull annimal.

— Tabulazzjoni tal-konsum tal-ikel

— Tabulazzjoni ta' dejta ta' patoloġija klinika

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfażi partikolari għad-deskrizzjoni tal-metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-konċentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-partiċelli.

— Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni fil-partiċelli, meqjusin is-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-partiċelli ma setgħux jitħarsu;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probbbali tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati.

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm ħtieġa li b'mod uman jinqatlu annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).

— L-organu/i mmirat(i) għandu/hom jiġi/u identifikat/i.

— NOAEL u LOAEL għandhom ikunu ddeterminati.

LETTERATURA:

(1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP u Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-Ittestjar: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

B.30. STUDJI DWAR TOSSIĊITÀ KRONIKA

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 452 (2009) tal-OECD. It-TG 452 oriġinali kienet adottata fl-1981. L-iżvilupp ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.30 rivedut tqies li kien meħtieġ biex jirrifletti żviluppi reċenti fil-qasam tat-trattament xieraq tal-annimali u ta' rekwiżiti regolatorji (1) (2) (3) (4). L-aġġornament ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.30 twettaq flimkien ma' reviżjonijiet tal-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness: Studji dwar il-Karċinoġeniċità u tal-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness, Studji Kombinati dwar Tossiċità Kronika/karċinoġeniċità, bil-għan li jinkiseb tagħrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jingħataw aktar dettalji dwar l-għażla tad-doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgħa ta' kimiċi, inkluż pestiċidi u kimiċi industrijali.

2. Il-maġġoranza tal-istudji dwar tossiċità kronika jsiru fi speċijiet ta' rodituri, u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, maħsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu meħtieġa fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, il-prinċipji u l-proċeduri li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, flimkien ma' dawk li l-profil tagħhom jinsab fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (5), jistgħu wkoll ikunu applikati, b'modifiki xierqa, skont il-profil tagħhom fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD dwar Tfassil u Twettiq ta' Studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (6).

3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar tossiċità kronika huma orali, dermali u ta' inalazzjoni. L-għażla tar-rotta ta' amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tal-kimika għall-ittestjar u mir-rotta predominanti ta' espożizzjoni umana. Informazzjoni addizzjonali dwar l-għażla ta' rotta ta' espożizzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD (6).

4. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiffoka fuq espożizzjoni permezz tar-rotta orali, ir-rotta li komunement l-aktar li tintuża fi studji dwar tossiċità kronika. Filwaqt li studji fit-tul dwar tossiċità kronika li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotot dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu meħtieġa għall-valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħħa tal-bniedem u/jew jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji, iż-żewġ rotot ta' espożizzjoni jinvolvu kumplessità teknika konsiderevoli. Studji bħal dawn ikun jeħtiġilhom jitfasslu abbażi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika b'amministrazzjoni orali jista' jifforma l-bażi ta' protokoll għal studji dwar inalazzjoni u/jew dermali, fir-rigward ta' rakkomandazzjonijiet għal perjodi ta' trattament, parametri kliniċi u patoloġiċi, eċċ. Hemm gwida tal-OECD dwar l-amministrazzjoni ta' kimiċi għall-ittestjar bir-rotot ta' inalazzjoni (6) (7) u dermali (6). Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (8) u l-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (9), flimkien mad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar ittestjar ta' inalazzjoni akuta (7), għandhom ikunu kkonsultati b'mod speċifiku fit-tfassil ta' studji għal tul itwal ta' żmien li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta tal-inalazzjoni. Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (10) għandu jkun ikkonsultat fil-każ ta' ttestjar magħmul bir-rotta dermali.

▼M4

5. L-istudju dwar tossiċità kronika jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalgħu minn espożizzjoni ripetuta tul parti konsiderevoli mill-ħajja kollha tal-ispeċi użata. L-istudju għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tossiċi tal-kimika għall-ittestjar; jindika organi mmirati u l-possibbiltà ta' akkumulazzjoni. Jista' jipprovdi wkoll stima tal-livell bla effett ħażin osservat li tista' tintuża biex ikunu stabbiliti kriterji ta' sikurezza għal espożizzjoni umana. Qed issir enfażi wkoll dwar il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi li jixirqu tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.

6. L-għanijiet tal-istudji koperti minn dan il-Metodu ta' Ttestjar jinkludu:

— L-identifikazzjoni tat-tossiċità kronika ta' kimika għall-ittestjar;

— L-identifikazzjoni tal-organi mmirati;

— Il-karatterizzazzjoni tar-relazzjoni ta' doża-rispons;

— L-identifikazzjoni ta' livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) jew punt ta' tluq biex tkun stabbilita Doża ta' Riferiment (BMD);

— It-tbassir ta' effetti ta' tossiċità kronika f'livelli ta' espożizzjoni umana;

— Il-forniment ta' dejta biex ikunu ttestjati ipoteżijiet dwar modalità ta' azzjoni (6).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

7. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossikoloġiċi ta' kimika għall-ittestjar, l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju, biex it-tfassil tal-istudju jiffoka fuq l-ittestjar b'aktar effiċjenza għall-potenzjal ta' tossiċità kronika u biex l-użu tal-annimali jkun mill-anqas. Informazzjoni li għandha tassisti fit-tifsila tal-istudju tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; kull informazzjoni dwar il-modalità ta' azzjoni; riżultati ta' kull test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli u dejta tossikoloġika dwar kimiċi relatati strutturalment; dejta tossikokinetika disponibbli (doża waħda u wkoll kinetika ta' doża ripetuta meta tkun disponibbli) u dejta derivata minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjonijiet. Id-determinazzjoni ta' tossiċità kronika għandha ssir biss wara li tkun inkisbet informazzjoni inizjali dwar tossiċità minn doża ripetuta għal 28 jum u/jew minn testijiet ta' tossiċità għal 90 jum. Approċċ ta' ttestjar f'fażijiet għal ittestjar ta' tossiċità kronika għandu jitqies bħala parti mill-valutazzjoni globali tal-effetti potenzjali ħżiena għas-saħħa ta' kimika partikolari għall-ittestjar (11) (12) (13) (14).

8. Il-metodi ta' statistika l-aktar adatti għall-analiżi ta' riżultati, meqjusin it-tifsila u l-għanijiet sperimentali, għandhom ikunu stabbiliti qabel ma jingħata bidu għall-istudju. Kwistjonijiet li għandhom jitqiesu jinkludu jekk l-istatistika għandhiex tinkludi aġġustament għal sopravivenza u analiżi fil-każ ta' tmiem ħesrem ta' grupp wieħed jew aktar. Gwida dwar l-analiżi xierqa ta' statistika u referenzi ewlenin għal metodi ta' statistika aċċettati internazzjonalment jingħataw fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6), u wkoll fid-Dokument ta' Gwida Nru 35 dwar l-analiżi u l-evalwazzjoni ta' studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (15).

▼**M4**

9. Meta jkun qed isir studju dwar tossiċità kronika, il-prinċipji u l-konsiderazzjonijiet ta' gwida li l-profil tagħhom jinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 19 tal-OECD dwar l-għarfien, il-valutazzjoni u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem b'mod uman għal annimali għall-esperimenti użati f'evalwazzjoni tas-sikurezza (16), b'mod partikolari l-paragrafu 62 tiegħu, għandhom ikunu segwiti dejjem. Dan il-paragrafuq jiddikjara li "*Fi studji li jinvolvu dożaġġ ripetut, meta annimal juri sinjali kliniċi li huma progressivi, u jwasslu għal iktar deterjorament fil-kundizzjoni, għandha tittieħed deċiżjoni infurmata dwar jekk l-annimal għandux jinqatel b'mod uman jew le. Id-deċiżjoni għandha tinkludi konsiderazzjoni tal-valur tal-informazzjoni li għandha tinkiseb mill-manutenzjoni kontinwata ta' dak l-annimal fl-istudju, relattiv għall-kundizzjoni ġenerali tiegħu. Jekk tittieħed deċiżjoni biex l-annimal jibqa' fit-test, il-frekwenza tal-osservazzjonijiet għandha tiżdied, skont il-bżonn. Jista' jkun possibbli wkoll, mingħajr ma jaffettwa b'mod avvers l-iskop tat-test, li d-dożaġġ jieqaf temporanjament jekk dan ħa jtaffi l-uġigħ jew l-iskumdità, jew li tonqos id-doża tat-test.*"

10. Gwida dettaljata u diskussjoni dwar il-prinċipji tal-għażla ta' doża għal studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6), kif ukoll f'żewġ pubblikazzjonijiet tal-Internazzjonali Life Sciences Institute (17) (18). L-istrateġija bażika tal-għażla tad-doża tkun tiddependi mill-għan jew għanijiet primarji tal-istudju (il-paragrafu 6). Fl-għażla ta' livelli xierqa ta' doża, għandu jinkiseb bilanċ bejn tgħarbil ta' perikli minn naħa waħda u karatterizzazzjoni ta' risponsi għal doži baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naħa l-oħra. Dan huwa partikolarment rilevanti fis-sitwazzjoni fejn ikollu jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness) (il-paragrafu 11).

11. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness), milli eżekuzzjoni separata ta' studju dwar tossiċità kronika (dan il-Metodu ta' Ttestjar B.30) u studju tal-karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness). It-test konġunt jipprovdi aktar effiċjenza fir-rigward ta' ħin u spejjeż imqabblin ma' meta jsiru żewġ studji separati, mingħajr ħsara għall-kwalità tad-dejta fil-faži kronika jew fil-faži ta' karċinoġeniċità. Iżda għandhom jitqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 9 u 20-25) meta jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness), u huwa rikonoxxut ukoll li jistgħu jkunu meħtieġa studji separati f'ċerti oqfsa regolatorji.

12. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6).

PRINĊIPJU TAT-TEST

13. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'doži gradwati lil diversi gruppi ta' annimali għall-esperimenti, normalment għal perjodu ta' 12-il xahar, għalkemm jistgħu jintgħażlu wkoll perjodi itwal jew aqsar skont rekwiżiti regolatorji (ara l-paragrafu 33). Dan il-perjodu jintgħażel li jkun twil biżżejjed biex kull effett ta' tossiċità kumulattiva jsir jidher, mingħajr l-effetti ta' taħwid ta' bidliet ġerjatriċi. Devjazzjonijiet minn perjodu ta' espożizzjoni ta' 12-il xahar għandhom ikunu ġġustifikati, l-aktar fil-każ ta' perjodi aqsar. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata bir-rotta orali għalkemm l-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni jew dermali jista' wkoll ikun adattat. It-tifsila tal-istudju tista' tinkludi wkoll qatla interim waħda jew aktar, eż. fit-3 jew fis-6 xahar, u jistgħu jkunu inklużi gruppi addizzjonali ta' annimali biex dan isir (ara l-paragrafu 19). Matul il-perjodu ta' amministrazzjoni l-annimali jkunu osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

▼M4

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimali

14. Dan il-Metodu ta' Ttestjar primarjament ikopri l-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika f'rodituri (ara l-paragrafu 2), għalkemm huwa rikonoxxut li studji simili f'annimali mhux rodituri jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji. L-għażla ta' speċi għandha tkun iġġustifikata. It-tfassil u t-twettiq ta' studji dwar tossiċità kronika fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, meta jkunu meħtieġa, għandhom ikunu bbażati fuq il-prinċipji li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar flimkien ma' dawk fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness, Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (5). Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' speċi u razza hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6).

15. F'dan il-Metodu ta' Ttestjar, l-ispeċi ppreferuta ta' rodituri huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' rodituri, eż. il-ġurdien. Firien u ġrieden kienu l-mudelli ppreferuti għall-esperimenti minħabba l-ħajja relattivament qasira tagħhom, l-użu kbir li jsir minnhom fi studji farmakoloġiċi u tossikoloġiċi, is-suxxettibbiltà tagħhom għal induzzjoni ta' tumur u li minnhom hemm razez karatterizzati biżżejjed. Bħala konsegwenza ta' dawn il-karatteristiċi, hemm ammont kbir ta' informazzjoni dwar il-fiżjoloġija u l-patoloġija tagħhom. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju dwar tossiċità kronika għandu jkun magħmul f'annimali mill-istess razza u sors bħal dawk użati fi studju/i preliminari dwar tossiċità li jdum(u) anqas. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf

16. L-annimali jistgħu jitqiedu jabitaw individwalment, jew jitqiegħdu f'gaġeġ fi gruppi żgħar tal-istess sess; abitazzjoni individwali għal kull annimal għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (19) (20) (21). Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minħabba t-tqegħid ta' gaġeġ. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx 70 % minbarra matul il-ħasil tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. Id-dieta għandha tissodisfa l-ħtiġijiet nutrizzjonali kollha tal-ispeċi ttestjata u l-kontenut ta' kontaminanti tad-dieta, inklużi iżda mhux limitatament għal residwi ta' pestiċidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestroġeni, metalli tqal u mikotossini, li jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultat tat-test, għandu jkun baxx kemm jista' jkun. Informazzjoni analitika dwar il-livelli ta' kontaminanti tan-nutrijent u tad-dieta għandha tkun iġġenerata perjodikament, mill-anqas fil-bidu tal-istudju u meta jkun hemm bidla fil-lott użat, u għandha tkun inkluża fir-rapport finali. Bl-istess mod għandha tkun ipprovduta informazzjoni analitika dwar l-ilma tax-xorb użat fl-istudju. L-għażla ta' dieta tista' tkun influwenzata mill-ħtieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-ħtiġijiet nutrizzjonli tal-annimali meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tar-rotta tad-dieta.

Preparazzjoni tal-annimali

17. Għandhom jintużaw annimali f'saħħithom, li jkunu ġew akklimatizzati għal kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-anqas 7 ijiem li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. Fil-każ ta' rodituri, id-dożaġġ tal-annimali għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara ftim u akklimatazzjoni u preferibbilment qabel ma l-annimali jkun għandhom 8 ġimgħat. L-annimali tat-test għandhom ikunu kkaratterizzati fir-rigward ta' speċi, razza, sors, sess, piż u età. Malli jinbeda l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż għal kull sess tal-annimali użati għandha tkun minimali u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju tal-annimali kollha fl-istudju, separatament għal kull sess. L-annimali għandhom ikunu

▼M4

assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. Wara l-każwalità, m'għandux ikun hemm differenzi sinifikanti fil-piżijiet medji tal-ġisem bejn gruppi f'kull sess. Jekk ikun hemm differenzi sinifikanti ta' statistika, f'dak il-każ il-proċedura ta' każwalità għandha tkun ripetuta, jekk ikun possibbli. Kull annimal għandu jkun assenjat numru ta' identifikazzjoni uniku, u jkun immarkat b'mod permanenti b'dan in-numru b'tatù, b'impjant ta' mikroċipp jew b'metodu ieħor adattat.

PROĊEDURA

Għadd u sess tal-annimali

18. Għandhom jintużaw iż-żewġ sessi. Għandu jintuża għadd suffiċjenti ta' annimali biex meta l-istudju jintemm ikun hemm annimali biżżejjed f'kull grupp għal evalwazzjoni bijoloġika u ta' statistika bir-reqqa. Għar-rodituri għandhom normalment jintużaw mill-anqas 20 annimal minn kull sess minn kull grupp f'kull livell ta' doża, filwaqt li għal annimali mhux rodituri huwa rrakkomandat minimu ta' 4 minn kull sess minn kull grupp. Fi studji li jinvolvu ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali addizzjonali f'kull grupp ta' doża biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha.

Provvediment għal qatliet interim, gruppi satellitarji u annimali sentinelli

19. L-istudju jista' jagħmel provvediment għal qatliet interim (mill-anqas 10 annimali/sess/grupp), eż. kull sitt xhur, biex jagħti informazzjoni dwar il-progressjoni tal-bidliet tossikoloġiċi u informazzjoni mekkanistika, jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Fejn diġà jkun hemm informazzjoni bħal din mill-istudji preċedenti ta' tossiċità ta' doża ripetuta dwar il-kimika għall-ittestjar, qatliet interim jistgħu ma jkunux xjentifikament ġustifikati. Gruppi satellitarji jistgħu wkoll ikunu inklużi biex jimmonitorjaw ir-riversibbiltà ta' kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata; dawn normalment ikunu ristretti għall-ogħla livell ta' doża tal-istudju flimkien ma' kontroll. Jista' wkoll ikun inkluż grupp addizzjonali ta' annimali sentinelli (tipikament 5 annimali għal kull sess) għall-monitoraġġ ta' stat ta' mard, jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju (22). Jekk ikunu ppjanati qatliet interim jew li jiddaħħlu gruppi satellitarji jew ta' sentinelli, l-għadd ta' annimali inklużi fit-tifsila tal-istudju għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimalii li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Dawn l-annimali għandhom normalment isirulhom l-istess osservazzjonijiet, inkluż il-piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma, il-kejlijiet ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika u investigazzjonijiet patoloġiċi bħall-annimali fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju ewlieni, għalkemm jista' wkoll ikun hemm provvediment (fil-gruppi ta' qtil interim) biex il-kejlijiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità.

Gruppi ta' dożi u dożaġġ

20. Gwida dwar l-aspetti kollha ta' għażla ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6). Mill-anqas għandhom jintużaw tliet livelli ta' doża u kontroll konkurrenti, ħlief meta jsir test ta' limitu (ara l-paragrafu 27). Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

▼**M4**

21. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, normalment għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex ikunu identifikati l-organi prinċipali u l-effetti tossiċi filwaqt li jkunu evitati tbatija, tossiċità severa, morbidità jew mewt. Filwaqt li jitqiesu l-fatturi li l-profil tagħhom jinsab fil-paragrafu 22 hawn taħt, għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex jislet evidenza ta' tossiċità, kif ikun jidher, pereżempju, minn tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-ġisem (madwar 10 %).

22. Iżda, skont x'ikunu l-għanijiet tal-istudju (ara l-paragrafu 6), tista' *tintgħażel l-ogħla doża anqas mid-doża* li tipprovdi evidenza ta' tossiċità, *eż. jekk doża tislet effett avvers ta' tħassib iżda li madankollu jkollha ftit impatt fuq il-ħajja jew il-piż tal-ġisem. L-ogħla*doża m'għandhiex tkun aktar minn 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum (doża ta' limitu, ara l-paragrafu 27).

23. Jistgħu jintgħażlu livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża biex ikunu stabbiliti doża-rispons u NOAEL jew riżultat maħsub ieħor tal-istudju, eż. BMD (ara l-paragrafu 25) fil-livell ta' doża l-aktar baxx. Fatturi li għandhom jitqiesu fl-għoti ta' dożi aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-dożi li fihom jistgħu jseħħu bidliet importanti fil-metaboliżmu jew il-modalità ta' azzjoni tossika, fejn ikun mistenni limitu, jew fejn ikun mistenni punt ta' tluq għal estrapolazzjoni ta' doża baxxa.

24. L-ispazjar magħżul ta' livelli ta' doża jkun jiddependi mill-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar, u ma jistax ikun preskritt f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, iżda intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss jipprovdu prestazzjoni tajba ta' test meta jintużaw biex ikunu stabbiliti l-livelli minn fuq għal isfel ta' dożi, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' test sikwit hija preferibbli mill-użu ta' intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' madwar 6-10) bejn dożaġġi. B'mod ġenerali l-użu ta' fatturi akbar minn 10 għandu jkun evitat, u għandu jkun iġġustifikat jekk ikun applikat.

25. Kif spjegat aktar fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6), il-punti li għandhom jitqiesu fl-għażla ta' doża jinkludu:

— Nonlinearitajiet magħrufin jew suspettati jew punti ta' infezzjoni fid-doża-rispons;

— Tossikokinetika u firxa ta' dożi fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn dożi esterni u interni jseħħu jew ma jseħħux;

— Leżjonijiet prekursuri, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;

— Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta' modalità ta' azzjoni, bħal dożi li fihom tibda tfaqqa' ċ-ċitotossiċità, livelli ta' ormoni jitħawdu, mekkaniżmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;

— Reġjuni tal-kurva ta' doża-rispons fejn tkun meħtieġa stima partikolarment robusta, eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;

— Konsiderazzjoni ta' livelli antiċipati ta' espożizzjoni umana.

▼M4

26. Il-grupp ta’ kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta’ kontroll ta’ vejjikoli jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Ħlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta’ kontroll għandhom ikunu maniġġati b’mod identiku bħal dawk fil-gruppi tat-test. Jekk jintuża vejjikolu, il-grupp ta’ kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-ogħla volum użat fost il-gruppi ta’ doża. Jekk kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, u tikkawża li jittieħed anqas ikel tad-dieta b’mod sinifikanti minħabba dieta b’anqas palat, grupp ta’ kontroll addizzjonali ta’ tmigħ lil pari jista’ jkun utli biex iservi ta’ kontroll aktar adattat.

27. Jekk jista’ jkun antiċipat, abbażi ta’ informazzjoni minn studji preliminari, li test f’livell ta’ doża waħda, ekwivalenti għal mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum, billi jintużaw il-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, aktarx ma jipproduċix effetti ħżiena u ma tkunx mistennija tossiċità abbażi ta’ dejta minn kimiċi relatati strutturalment, f’dak il-każ studju sħiħ bl-użu ta’ tliet livelli ta’ doża jista’ ma jitqisx li jkun meħtieġ. Jista’ jkun japplika limitu ta’ 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum ħlief meta espożizzjoni umana tindika l-ħtieġa li jkollu jintuża livell ogħla ta’ doża.

Preparazzjoni ta’ doži u amministrazzjoni ta’ kimika għall-ittestjar

28. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata oralment, permezz tad-dieta jew ilma tax-xorb, jew b’gavage. Informazzjoni addizzjonali dwar rotot u metodi ta’ amministrazzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (6). Ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-għan tal-istudju, mill-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mid-disponibbiltà bijoloġika tagħha u mill-metodu ta’ espożizzjoni umana. Għandu jkun ipprovdut motiv għar-rotta magħżula u għall-metodu ta’ amministrazzjoni. Fl-interessi ta’ trattament xieraq tal-annimali, gavage orali għandu normalment jintgħażel biss għal dawk l-aġenti li għalihom din ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni raġonevolment jirrappreżentaw espożizzjoni potenzjali umana (eż. farmaċewtiċi). Għal kimiċi ta’ dieta jew ambjentali inklużi pestiċidi, l-amministrazzjoni tipikament issir permezz tad-dieta jew b’ilma tax-xorb. Iżda, għal xi xenarji, eż. espożizzjoni okkupazzjonali, amministrazzjoni permezz ta’ rotot oħra tista’ tkun aktar adattata.

29. Meta jkun meħtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinħall jew tiġi sospiża f’vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u addittivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprjetajiet kimiċi tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u effetti fuq l-ikel jew fuq il-konsum tal-ilma jew fuq l-istat nutrizzjonali tal-annimali. Huwa rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jitqies l-użu ta’ soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, u wara titqies soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b’soluzzjoni f’vejjikoli oħra. Għal vejjikoli oħra minbarra ilma, il-karatteristiċi tossiċi tal-vejjikolu għandhom ikunu magħrufa. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar l-istabbiltà tal-kimika għall-ittestjar u l-omoġeneità ta’ soluzzjonijiet ta’ dożaġġ jew dieti (kif jixraq) skont il-kundizzjonijiet ta’ amministrazzjoni (eż. dieta).

30. Għall-kimiċi amministrati permezz tad-dieta jew l-ilma tax-xorb, huwa importanti jkun żgurat li l-kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Fi studji fit-tul dwar tossiċità bl-użu ta’ amministrazzjoni ta’ dieta, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-għalf m’għandhiex tkun aktar ‘il fuq mil-limitu ta’ 5 % tad-dieta totali, biex ikunu evitati żbilanċi nutrizzjonali. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw jew konċentrazzjoni kostanti ta’ dieta (mg/kg dieta jew ppm) jew livell wieħed kostanti ta’ doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgħa. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼M4

31. Fil-każ ta’ amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-ġimgħa), normalment għal perjodu ta’ 12-il xahar (ara wkoll il-paragrafu 33), għalkemm jista’ jkun meħtieġ perjodu itwal skont rekwiżiti regolatorji. Kull reġim ieħor ta’ dożaġġ, eż. ħamest ijiem fil-ġimgħa, jeħtieġlu jkun iġġustifikat. Fil-każ ta’ amministrazzjoni dermali, annimali jkunu normalment ittrattati bil-kimika għall-ittestjar għal mill-anqas 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, kif speċifikat fil-Kapitolu B.9 ta’ dan l-Anness (10), għal perjodu ta’ 12 xahar. Espożizzjoni bir-rotta tal-inalazzjoni ssir għal 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, iżda tista’ tintuża wkoll espożizzjoni għal 5 ijiem fil-ġimgħa, jekk dan ikun ġustifikat. Il-perjodu ta’ espożizzjoni jkun normalment għal perjodu ta’ 12 xahar. Jekk speċijiet ta’ rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta’ espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta tintuża espożizzjoni li ddum anqas minn 6 sigħat kuljum. Ara wkoll il-Kapitolu B.8 ta’ dan l-Anness (8).

32. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b’gavage lill-annimali dan għandu jsir billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta’ intubazzjoni adattat, f’ħinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża waħda darba kuljum, meta pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista’ jkun possibbli li tinżamm ir-rata ta’ doża kuljum billi din tkun amministrata bħala doża maqsuma (darbtejn kuljum). Il-volum massimu ta’ likwidu li jkun jista’ jiġi amministrat f’waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum għandu jinżamm baxx daqs kemm ikun prattikabbli, u normalment m’għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem għal rodituri (22). Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistgħu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jeħtiġilhom jiġu dilwiti biex ikunu evitati effetti lokali severi. Ittestjar f’konċentrazzjonijiet li x’aktarx ikunu korrużivi jew irritanti għas-sistema gastrointestinali għandu jkun evitat.

Durata tal-istudju

33. Filwaqt li dan il-Metodu ta’ Ttestjar huwa mfassal primarjament bħala studju ta’ 12-il xahar dwar tossiċità kronika, it-tifsila tal-istudju tippermetti wkoll u tista’ tkun applikata għal studji jew li jdumu anqas (eż. 6 jew 9 xhur) jew aktar (eż. 18 jew 24 xahar), skont ir-rekwiżiti ta’ reġimi regolatorji partikolari jew għal għanijiet mekkanistiċi speċifiċi. Devjazzjonijiet minn espożizzjoni li ddum 12-il xahar għandhom ikunu ġġustifikati, l-aktar fil-każ ta’ dawk li jdumu anqas. Gruppi satellitarji inklużi għall-monitoraġġ tar-riversibbiltà ta’ kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata għandhom jinżammu mingħajr dożaġġ għal perjodu ta’ mhux anqas minn 4 ġimgħat u ta’ mhux aktar minn terz ta’ kemm idum l-istudju totali wara li tkun intemmet espożizzjoni. Gwida ulterjuri, inkluża konsiderazzjoni ta’ sopravivenza fl-istudju, hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (6).

OSSERVAZZJONIJIET

34. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbiditàjew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u t-tmiem ta’ kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. Osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-anqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin(ijiet) kull jum, filwaqt li jitqies il-perjodu massimu ta’ effetti antiċipati wara dożaġġ fil-każ ta’ amministrazzjoni b’gavage.

▼M4

35. Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru fuq l-annimali kollha mill-anqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (biex jitħallew isiru paraguni skont is-suġġett), fi tmiem l-ewwel ġimgħa tal-istudju u kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-protokoll għal osservazzjonijiet għandu jkun magħmul b'mod li varjazzjonijiet bejn osservaturi individwali jkunu mminimizzati u indipendenti minn grupp ta' test. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra mill-gaġġa ta' abitazzjoni, preferibbilment f'arena standard u f'ħinijiet simili għal kull jum f'kull okkażjoni. Huma għandhom ikunu rreġistrati sewwa, preferibbilment billi jintużaw sistemi ta' punti, iddefiniti espliċitament mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandhom isiru sforzi biex ikun żgurat li varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' osservazzjoni jkunu minimi. Sinjali nnotati għandhom jinkludi, iżda ma jkunux limitati għal, bidliet fil-ġilda, pil, għajnejn, membrani mukużi, okkorrenza ta' sekrezzjonijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż. tidmigħ, erezzjoni tal-pil, daqs tal-pupilli, u xejra respiratorja mhux tas-soltu). Bidliet fil-mixja, qagħda u rispons għal immaniġġar, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv) jew imġiba biżarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (24).

36. Eżami oftalmoloġiku, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir ieħor adattat, għandu jsir fuq l-annimali kollha qabel l-ewwel amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Fit-tmiem tal-istudju, dan l-eżami għandu preferibbilment isir għall-annimali kollha iżda mill-anqas fid-doża għolja u fil-gruppi ta' kontroll. Jekk fl-għajnejn jinstabu bidliet relatati ma' trattament, l-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati. Jekk analiżi strutturali jew informazzjoni oħra jissuġġerixxu tossiċità okulari, f'dak il-każ il-frekwenza ta' eżami okulari għandha tiżdied.

37. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta' tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti newrotossiċi, ikunu jistgħu jsiru b'mod fakultativ valutazzjoni ta' reattività sensorja għal stimuli ta' tipi differenti (24) (eż. stimuli tas-smigħ, viżivi u proprjoċettivi) (25), (26), (27), valutazzjoni tal-qawwa tal-qabda (28) u valutazzjoni tal-attività motorja (29) qabel il-bidu tal-istudju u f'perjodi ta' 3 xhur wara li jkun beda l-istudju sa u inklużi 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar). Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi.

38. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta' tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti immunotossiċi, investigazzjonijiet ulterjuri ta' dan il-punt ta' tmiem ikunu jistgħu jsiru b'mod fakultattiv fit-tmiem.

Piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma u effiċjenza fl-ikel

39. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa, u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejlijiet ta' konsum ta' ikel u ta' effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem meta l-kimika tkun amministrata fl-ilma tax-xorb. Għandhom jitqies wkoll kejlijiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

▼M4

Ematoloġija u bijokimika klinika

40. Fi studji li jinvolvu rodituri, għandhom isiru eżamijiet ematoloġiċi f'mill-anqas 10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp, kull 3, 6, u 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar), billi jintuża l-istess annimal il-ħin kollu. Għal ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha (ara l-paragrafu 18). Fi studji ta' annimali mhux rodituri, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'ħinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal rodituri. Il-kejlijiet kull 3 xhur, għal rodituri jew għal annimali mhux rodituri, jistgħu ma jsirux jekk ma jkunu dehru ebda effetti fuq parametri ematoloġiċi fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Għandhom jittieħdu kampjuni tad-demm minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardijaku jew minn sinus retroorbitali, b'anestesija.

41. Il-lista ta' parametri li ġejja għandha tkun investigata (30): Għadd total u differenzjali ta' lewkoċiti, għadd ta' eritroċiti, għadd ta' pjastrini, konċentrazzjoni ta' emoglobina, ematokrit (volum ta' ċelluli ppakkjati), volum korpuskulari medju (MCV), emoglobina korpuskulari medja (MCH), konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja (MCHC), ħin protrombin u ħin tromboplastin parzjali attivat. Parametri ematoloġiċi oħra bħal korpi ta' Heinz jew morfoloġija atipika oħra ta' eritroċiti jew metemoglobina jistgħu jitkejlu kif jixraq skont it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, għandu jkun adottat approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar. Jekk il-kimika għall-ittestjar ikollha effett fuq is-sistema ematopojetika, jistgħu jkunu indikati wkoll għedud ta' retikoloċiti u ċitoloġija tal-mudullun tal-għadam, għalkemm dawn għandhom isiru b'rutina.

42. Determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika għall-investigazzjoni ta' effetti tossiċi maġġuri f'tessuti u, speċifikatament, ta' effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demm miksubin minn mill-anqas 10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp fl-istess intervalli ta' ħin kif speċifikat għall-investigazzjonijiet ematoloġiċi, billi jintuża l-istess annimal il-ħin kollu. Għal ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika kollha meħtieġa. Fi studji ta' annimali mhux rodituri, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'ħinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal rodituri. Jistgħu ma jsirux kejlijiet kull 3 xhur għal rodituri jew għal annimali mhux rodituri jekk ma jkun deher ebda effett fuq parametri ta' bijokimika klinika fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Huwa rrakkomandat is-sawm matul il-lejn tal-annimalli (bl-eċċeżżjoni tal-ġrieden) qabel it-teħid tal-kampjuni tad-dehem. Il-lista ta' parametri li ġejja għandha tkun investigata (30): glukożju, urea (nitroġenu tal-urea), kreatinina, proteina totali, albumina, kalċju, sodju, potassju, kolesterol totali, mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatoċellulari (aminotransferaži tal-alanina, aspartate aminotransferaži, glutamat ta' deidroġenaži, aċidi totali tal-bili) (31), u mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatobiljari (fosfataži alkalina, gamma glutamil trasferimentaži, 5'-nukleotidaži, bilirubina totali, aċidi totali tal-bili) (31). Parametri oħra ta' bijokimika klinika bħal trigliċeridi sajmin, ormoni speċifiċi u kolinesteraži jistgħu jitkejlu kif jixraq, skont it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, hemm ħtieġa ta' approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar.

▼M4

43. Determinazzjonijiet ta' analiżi tal-awrina għandhom isiru fuq mill-anqas 10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp fuq kampjuni miġburin fl-istess intervalli bħal dawk għall-ematoloġija u l-kimika klinika. Ma jkunx meħtieġ isiru kejlijiet kull 3 xhur jekk ma jkun deher ebda effett fuq analiżi tal-awrina fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Il-lista ta' parametri li ġejja kienet inkluża f'rakkomandazzjoni esperta dwar studji ta' patoloġija klinika (30): dehra, volum, ożmolalità jew gravità speċifika, pH, proteina totali u glukożju. Determinazzjonijiet oħra jinkludu keton, urobilinoġenu, bilirubina u demm moħbi. Jistgħu jintużaw aktar parametri meta jkun meħtieġ biex tkun estiża l-investigazzjoni ta' effett(i) osservat(i).

44. Huwa meqjus b'mod ġenerali li jeħtieġu varjabbli bażi ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel trattament għal studji dwar il-klieb, iżda ma jeħtiġilhomx ikunu ddeterminati fi studji dwar rodituri (30). Iżda, jekk dejta bażi storika (ara l-paragrafu 50) ma tkunx adegwata, għandu jitqies li tkun iġġenerata dejta bħal din.

Patoloġija

Awtopsja makroskopika

45. L-annimali kollha fl-istudju normalment għandhom ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Iżda jista' wkoll ikun hemm provvediment (fil-qatla interim jew fi gruppi satellitarji) biex kejlijiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità (ara l-paragrafu 19). Dawn l-annimali jistgħu ma jkunux soġġetti għal awtopsja u għall-proċeduri sussegwenti deskritti fil-paragrafi li ġejjin. L-annimali sentinelli jista' jkun jeħtiġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju.

46. Piżijiet ta' organi għandhom jinġabru mill-annimali kollha, minbarra dawk eskluži bil-parti tal-aħħar tal-paragrafu 45. L-adrenali, il-moħħ, l-epididimi, il-qalb, il-kliewi, il-fwied, l-ovarji, il-milsa, it-testikoli, it-tirojde (jintiżnu wara fissazzjoni, ma' paratirojdi), u l-utru tal-annimali kollha (minbarra ta' dawk misjubin qed imutu u/jew qed jinqatlu fil-frattemp) għandhom jintraqmu minn kull tessut imwaħħal magħhom, kif jixraq, u l-piż tagħhom fl-imxarrab għandu jittieħed malajr kemm jista' jkun wara dissezzjoni biex ma jitħalliex ikun hemm inxif. Fi studju li juża l-ġrieden, l-użin tal-glandoli adrenali huwa fakultattiv.

47. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (32) (tessuti f'parenteżi kwadri huma fakultattivi):

il-leżjonijiet kbar kollha	qalb	frixa	stonku (il-parti quddimija tal-istonku, stonku glandolari)
glandola adrenali	ileu	glandola tal-paratirojde	[snien]
aorta	jejunum	nerv periferali	testikoli
moħħ (inkluži taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/mežoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugħ (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]

▼M4

glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-ħoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inklużi mnieħer, turbinati u sinus paranażali]	ġilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtoraċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vaġina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-għadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-għadam
Glandola ta' Harder			

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermali ta' amministrazzjoni, il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandhom ikunu ppreservati, u t-teħid ta' kampjuni speċifiċi u l-preservazzjoni tal-ġilda mis-sit ta' applikazzjoni huma essenzjali. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (8) u tal-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (9). Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

Istopatoloġija

48. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (32). L-eżamijiet istopatoloġiċi minimi għandhom ikunu:

— it-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;

— it-tessuti kollha minn annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;

— it-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi;

— tessuti mmirati jew tessuti li wrew bidliet relatati ma' trattament fil-grupp ta' doża għolja, mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;

— fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu eżaminati.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

49. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. Addizzjonalment, id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali fil-bidu tat-test, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kull mewta jew qatla b'mod uman, l-għadd ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż iż-żmien meta jibdew ifaqqgħu, durata u severità ta' kull effett tossiku, l-għadd ta' annimali li juru leżjonijiet, it-tip ta' leżjonijiet u l-perċentwali tal-annimali li juru kull tip ta' leżjoni. Tabelli ta' sommarji ta' dejta għandhom jipprovdu l-mezzi u d-devjazzjonijiet standard (għal dejta ta' test kontinwu) ta' annimali li juru effetti tossiċi jew leżjonijiet, minbarra l-gradazzjoni tal-leżjonijiet.

50. Dejta storika ta' kontroll tista' tkun siewja fl-interpretazzjoni tar-riżultati tal-istudju, eż. fil-każ meta jkun hemm indikazzjonijiet li d-dejta pprovduta mill-kontrolli konkurrenti tkun sostanzjalment diversa meta mqabbla ma' dejta reċenti minn annimali ta' kontroll mill-istess faċilità/kolonja tat-test. Dejta storika ta' kontroll, jekk tkun evalwata, għandha tkun sottomessa mill-istess laboratorju u tkun tirrelata ma' annimali tal-istess età u razza ġġenerati matul il-ħames snin li jkunu ġew qabel l-istudju inkwistjoni.

51. Meta jkunu applikabbli, riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-metodi ta' statistika u d-dejta li jkollha tiġi analizzata għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju (paragrafu 8). L-għażla għandha tipprovdi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun meħtieġ.

Rapport tat-test

52. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-Ittestjar:

— natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni;

— sors tal-kimika;

— numru tal-lott;

— ċertifikat tal-analiżi tal-kimika

Vejjikolu (fejn xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma).

Annimali tat-test:

— speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;

— għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;

▼M4

— sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;

— piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;

— meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;

— dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta;

— dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;

— rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieħer jew il-ġisem kollu;

— dożi attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), u fattur ta' konverżjoni minn konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (mg/kg jew ppm) ta' dieta/ilma tax-xorb għad-doża attwali, jekk applikabbli;

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Riżultati (għandhom ikunu ppreżentati sommarji tad-dejta tabulata u dejta dwar annimali individwali):

— dejta dwar sopravivenza;

— piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— konsum ta' ikel, kalkulazzjonijiet ta' effiċjenza fl-ikel, jekk ikunu saru, u konsum tal-ilma jekk applikabbli;

— dejta ta' reazzjoni tossika skont is-sess u livell ta' doża, inklużi sinjali ta' tossiċità;

— natura, inċidenza (u, jekk bil-punti, severità), u dewmien ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk hux tranżitorji jew permanenti);

— eżami oftalmoloġiku;

— testijiet ematoloġiċi;

— testijiet ta' bijokimika klinika;

— testijiet ta' analiżi tal-awrina;

— riżultat ta' kull investigazzjoni ta' newrotossiċità jew immunotossiċità

— piż terminali tal-ġisem;

— piżijiet ta' organi (u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli);

— sejbiet minn awtopsji;

— deskrizzjoni dettaljata tat-trattamenti kollha relatati ma' sejbiet istopatoloġiċi;

— dejta ta' assorbiment jekk disponibbli;

▼M4

Trattament ta' statistika ta' riżultati, kif jixraq

Diskussjoni dwar riżultati inklużi:

— Doża: relazzjonijeit ta' rispons

— Konsiderazzjoni ta' kwalunkwe informazzjoni dwar il-modalità tal-azzjoni

— Diskussjoni dwar kull approċċ ta' mudellar

— Determinazzjoni ta' BMD, NOAEL jew LOAEL

— Dejta storika ta' kontroll

— Rilevanza għall-bnedmin

Konklużjonijiet

LETTERATURA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(5) Il-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali dwar Doża Ripetuta għal 90 Jum ta' Test ta' Subtossiċità Kronika Orali f'Annimali Mhux Rodituri.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subakuta: Studju ta' 28 Jum.

(9) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subkronika: Studju ta' 90 Jum.

(10) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossiċità (Dermali) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 - 837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Id-Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) 999-1003 Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendix 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼B

B.31. STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ FL-IŻVILUPP PRENATALI

1. METODU

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 414 (2001).

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' l-ittestjar żviluppanti tat-tossiċità huwa iddisinjat li jipprovdi informazzjoni ġenerali li tikkonċerna l-effetti ta' l-espożizzjoni prenatalifuq annimal tqil waqt it-test u fuq l-organiżmu żviluppanti in utero; dan jista' jinkludi l-assessjar ta' l-effetti maternali kif ukoll il-mewt, anormalitjiet strutturali, jew it-tkabbir mibdul tal-fetu. Id-difetti funzjonali, għalkemm parti importanti fl-iżvilupp, ma humiex parti integrali ta' dan il-metodu tat-test. Dawn jistgħu ikunu ittestjati għal studju separat jew bħala żieda ma dan l-istudju bl-użu tal-metodu tat-test għal newrotossiċità ta' l-iżvilupp. Għall-informazzjoni dwar it-testijiet għal defiċjenzi funzjonali u l-effetti l-oħrajm ta' wara t-twelid, il-Metodu tat-Test għal studju tat-tossiċità riproduttiva ta' żewġ ġenerazzjonijiet u l-istudju għal newrotossiċità ta' l-iżvilupp għandu jkun ikkonsultat skond kif xieraq.

Dan il-metodu tat-test jista' jeħtieġ adattazzjoni speċifika f'każi individwali fuq il-bażi ta' tagħrif speċifiku fuq, eż. il-propjetajiet fiżikokimiċi jew tossikoloġiċi tas-sustanza tat-test. Tali adattazzjoni hija aċċettabbli, meta evidenza xjentifika konvinċenti tissuġġerixxi li l-adattazzjoni tkun twassal għal test aktar informattiv. F'tali każ, din l-evidenza xjentifika għandha tkun dokumentata bir-teqqa fir-rapport ta' l-istudju.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossikoloġijata' l-iżvilupp: l-istudju ta' l-effetti ħżiena fuq l-organiżmi ta' l-iżvilupp li jistgħu jirriżultaw mill-espożizzjoni qabel il-konċepiment, matul żvilupp ta qabel it-twelid, jew ta' wara t-twelid għaż-żmien mal-maturutà sesswali. Il-manifestazzjonijiet maġġuri tat-tossiċità ta' l-iżvilupp jinkludu, 1) il-mewt ta' l-organiżmu, 2) l-annormalità strutturali, 3) tibdil fit-tkabbir, u 4) defiċjenza funzjonali. It-tossikoloċija ta' l-iżvilupp kienet preċedentament ta' spiss referuta bħala teratolġija.

Effett ħażin: Kwalunkwe alterazzjoni relatata mat-trattament minn linja bażi li tnaqqas l-abbiltà ta' l-organiżmu li jibqa ħaj, li jirriprodući jew li jadatta għall-ambjent. Fir-rigward tat-tossoloġija ta' l-iżvilupp, meqjusha fis-sens l-aktar wiesa, din tinkludi kwalunkwe effett li jinterferixxi mal-iżvilupp normali tal-conceptus, kemm qabel u wara t-twelid.

Tkabbir mibdul: Tibdil fl-organu naxxenti jew fil-piż tal-ġisem jew fid-daqs.

Alterazzjonijiet (annormalitajiet): Alterazzjonijiet strutturali fl-iżvilupp li jinkludu kemm il-malformazzjonijiet u wkoll varjazzjonijiet (28).

Malformazzjoni/Annormalità Maġġuri: Tibdil strutturali ikkunsidrat bħala detrimentali għall-annimal (jista' wkoll ikunu letali) u hija normalment rari.

▼B

Varjazzjoni/Annormalità Minuri: Tibdil strutturali meqjus bħala li jkollu ftit jew l-ebda effett strutturali fuq l-annimal; jista' jkun temporanju jew jista' jseħħ relattivament ta' spiss fil-popolozzjoni tal-kontroll.

Konċepiment: Is-summa tad-derivattivi ta' ovum fertilizzat fi kwalunkwe stadju ta' l-iżvilupp mill-fertilizzazzjoni sat-twelid, inklużi l-membrani extra-embrijoniċi kif ukoll l-embriju jew il-fetu.

Implantazzjoni (nidazzjoni): It-twaħħil tal-blastoċista ma l-inforra epiteljali ta' l-uteru, inkluż il-penetrazzjoni tagħha mill-epiteljum uterin, u t-twaħħil tagħha fil-endometrrijum.

Embriju: l-istadju kmieni jew żviluppanti ta' kwalunkwe organiżmu, speċjalment l-iżvilupp tal-prodott tal-fertilizzazzjoni tal-bajda wara l-assi t-twila tkun tidher u sakemm l-istrutturi maġġuri kollha jkunu preżenti.

Embijotossiċità: Detrimentali għall-istruttura normali, l-iżvilupp, it-tkabbir, u/jew il-viabbilità ta' embrijun.

Fetu: Il-wild mhux imwieled fil-perjodu post-embrijoniku.

Fetutossiċità: Detrimentali għall-istruttura normali, l-iżvilupp, it-tkabbir, u/jew il-viabbilità tal-fetu.

Abort: It-twarrib ta' qabel il-waqt mill-uteru tal-prodotti tal-konċepiment: ta' l-embrijun jew ta' fetu mhux-viabbli/

Reżorpzjoni: Konċepiment li, wara li jkun ġie impjantant fl-uteru, sussegwentament imut u jkun, jew kien, assorbit mill-ġdid.

Reżorpzjoni kmieni: Evidenza ta' l-implant mingħajr embrijun/fetu rikonoxxibbli.

Reżorpzjoni tard: Embrijun jew fetu mejjet b; tibdiliet esterni deġenerattivi.

NOAEL: Abbrevjazzjoni għal-livell ta' l-ebda effett avvers ma huwa osservabbli (no-observed-adverse-effect level) u hija l-għola doża jew livell ta' espożizzjoni meta l-ebda sejbiet avversi realatati mat-trattament ma jkunu osservati.

1.3. SUSTANZA TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Normalment, is-sustanzaa tat-test hija somministrata fuq annimali tqal għal mill-anqas mill-impjantazzjoni sa jum wieħed qabel il-jum skedat tal-qatla, li għandu jkun qrib kemm jista' jkun possibbli għall-jum normali tal-ħlas mingħajr ir-riskju ta' informazzjoni li tirriżulta minn ħlas kmieni. Il-metodu tat-test mhux intiż li jeżamina biss il-perjodu ta' lorganoġenesi, (eż. il-jiem 5-15 fl-annimal gerriema, u l-jiem 6-18 fil-fenek) imma wkoll l-effettu mill-pre-impjantazzjoni, meta xieraq, mutul il-perjodu kollu tal-ġestjoni sal-jum ta' qabel is-sezzjoni ċesarja. Ftit qabel is-sezzjoni ċesarjaa, il-femminili jkunu maqtula, il-kontenuti ta l-utru jkunu eżaminati, u l-fetu huma evalwati għan anomalitajiet esterni viżibbli u għal nisġiet rotob u tibdiliet skeletali.

▼B

1.5. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.5.1. **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

Huwa rrakkommandat li t-testijiet ikunu mwettqa fuq l-ispeċje l-aktar relevanti, u li l-ispeċje u r-razzez tal-laboratorju li huma normalment użati fit-testijiet dwar it-tossiċità fl-iżvilupp prenatali, jkunu użati. L-ispeċje ta' l-anniamli gerriema preferuta huja l-far u l-ispeċje ta' annimali mhux ġeggiema huwa l-fenek. Ġustifikazzjoni għandha tkun ipprovduta jekk ikun użat xi speċje ieħor.

1.5.2. **Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' fejn jinżammu l-annimali ta' l-esperiment għandha tkun 22 °C (± 3o) għall-annimali gerriema u 18 °C (± 3°) għall-fniek. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

Il-proċeduri ta' l-akkompanjament għandhom jitwettqu f'gaġġeġ adatti għal dak l-iskop. Meta gaġġeġ separati għall-annimali fl-akkompanjament huma preferuti, iż-żamma ta' numru żgħt f'ġagga waħda huwa wkoll aċċettabbli.

1.5.3. **Preparazzjoni ta' l-annimali**

Annimali b'saħħithom. Li jkunu ġew akklamatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mil anqas 5 ijiem u li ma jkunux ġew suġġetti għal proċeduri preċedenti sperimentali, għandhom ikunu użati. L-annimali tat-test għandhom ikunu karatterizzati bħala speċje, razza, sorsi, seww, piż u/jew l-età. L-annimali tal-gruppi kollha tat-test għandhom, kemm jista' jkun prattikabbli, ikunu ta' piż u età uniformi. Femmini adulti żgħażagħ li jkunu għadu ma weldux għandhom ikunu użati f'kull livell ta' doża. Il-femminili għandhom ikunu mgħammra ma maskili ta' l-istess speċje u razza, u t-tgħammir ma l-ulied għandu jkun evitat. Għall-annimali gerriema, il-jum 0 tal-gestazzjoni huwa l-jum li fih il-buq vaġinali u/jew l-isperma huma osservati; għall-fniek il-jum 0 huwa normalment il-jum tal-coitus jew ta' l-inseminazzjoni artifiċjali, jekk tkun użata dik it-teknika. In-nisa mgħammra għandhom ikunu aassenjati b'mod mingħajr preġudizju lejn gruppi tal-kontroll u t-trattament. Il-gaġġeġ għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid fil-gaġġeġ ikunu minimizzat. Kull annimal għandu jkun assenjat numru uniku ta' l-identifikazzjoni. In-nisa mgħammra għandhom ikunu assenjati b'manjera mingħajr preġudizzju lejn il-gruppi ta' kontroll u tat-trattament, u jekk in-nisa jkunu mgħammra f'lottijiet, l-annimali ta' kull lott għandhom ikunu imqassma b'mod egwali matul il-gruppi. Bl-istess mod, in-nisa seminati mill-istess raġel għandhom ikunu mqassma b'mod egwali matul il-gruppi.

1.6. PROĊEDURA

1.6.1. **In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Kull grupp tat-test u tal-kontroll għandu jinkludi numru suffiċjenti ta' femminili li jirriżulta f'madwar 20 annimal femmini bis-sita ta' l-implantazzjoni fin-nekropsija. Gruppi ta' anqas minn 16 il-annimal bis-sita ta' l-implantazzjoni jista' ma jkunx xieraq. Il-mortalià materna mhux neċessarjament tinvalida l-istudju, basta li din ma tkunx teċċedi madwar 10 %.

▼B

1.6.2. **Preparazzjoni tad-doża**

Jekk il-mezz jew l-adittiv l-ieħor ikun użat sabiex jiffaċilita d-doża, kunsiderazzjoni għandha tkun mogħtija għal dawn il-karatteristiċi li ġejjin: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu joħolqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ima jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali. Il-mezza la għandu jkun żviluppatament tossiku u l-anqas li jkollu effetti fuq ir-riproduzzjoni.

1.6.3. **Id-Doża**

Normalment, is-sustanza tat-test għandha tkun somministrata ta' kull jum mill-impjantazzjoni (eż. il-jum 5 minn wara t-tgħammir) sal jum ta' qabel is-sezzjoni neċessarju kif skedata. Jekk l-istudji preliminarji, meta disponibbli, ma jkunux jindikaw potenzjal għoli dwar it-telf pre-impjantazzjoni, it-trattament jista' jkun estiż li jinkludi l-perjodu intier tal-ġestjoni, mit-tgħamir sal-jum ta' qabel il-qatla skedata. Huwa ben magħruf li tqandil mhux sewwa jew xi taħbit matul it-tqala jista' jirriżulta f'telf prenatali. Sabiex ikun hemm ħarsien kontra t-telf prenatali minn fatturi li ma humiex relatati mat-trattament, tqandil bla ħtieġa ta' annimali tqal kif ukoll taħbit minn fatturi barranija bħal ma huma l-ħsejjes għandhom ikunu evitati.

Mill-anqas tlett livelli ta' doża u l-kontroll simultanju għandhom ikunu użati. Annimali b'saħħithom għandhom ikunu aassenjati b'mod mingħajr preġudizju lejn gruppi tal-kontroll u t-trattament. Il-livelli tad-doża għandhom ikunu mqassma sabiex jipproduċu l-effetti tossiċi tal-grad tat-tossiċità. Sakemm ma jkunx hemm limitazzjoni tal-propjetajiet tan-natura fiżika/limika jew bioloġika tas-sustanza tat-test, l-għola doża għandha tkun magħżula bil-għan li jkunu introdotti xi tossiċità ta' l-iżvilupp u/jew materna (sinjali kliniċi jew tnaqqis fil-piż tal-ġisem) imma mhux mewt jew sofferenza akuta. Mill-anqas livell ta' doża waħda intermedja għandu jipproduċi effetti tossiċi minimi osservati. Il-livell l-aktyar baxx m'għandux jipproduċi xi evidenza la ta' tossiċità materna u l-anqas ta' l-iżvilupp. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħżulha bil-għan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett ħażin mhu osservat (NOAEL). Tnejn- sa erba intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-doži. Għalkemm l-istebbeliment tal-NOAEL materni huwa l-għan, l-istudji li ma jista'bbilixxux tali livell jistgħu wkoll ikunu aċċettabbli 91).

Livelli ta' doži għandhom ikunu magħżula billi tkun meqjusa xi informazzjoni eżistenti kif ukoll l-informazzjoni addizzjonali dwar il-metaboliżmu u t-tossikukinetiċi tas-sustanza tat-test jew tal-materjali relatati. Din l-infomazzjoni għandha wkoll tgħin fid-demostrazzjoni ta' l-adekwatezza ta' l-amministrazzjoni tad-dożar.

Grupp ta' kontroll konkorrenti għandu jkun użat. Dan il-grupp għandu jkun grupp ta' kontroll ittrattat taparsi jew mezz ta' grupp ta' kontroll jekk mezz ikun użat fl-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-gruppi kollha għandhom ikunu amministrati l-istess volum jew tas-sustanza tat-test jew tal-mezz. L-annimali fil-grupp(i) tal-kontroll għandhom ikunu mqandla bl-istess manjiera bħal l-annimali fil-grupp tat-test. Il-gruppi bil-mezz ta' kontroll għandhom jirċievu l-mezz fl-għola ammont użat (bħal fil-gruppi ta' l-anqas trattament).

▼B

1.6.4. **Test tal-limitu**

Jekk test f'doża ta' livell wieħed ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum b'amministrazzjoni orali. Li jutilizza l-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma tipproduċi leba tossiċità osservabbli la fl-annimali tqal u l-anqas fil-proġenji tagħhom u jekk effett ma jkunx mistenni kif ibbażat fuq l-informazzjoni eżistenti (eż. minn taħlitiet strutturament u/jew metabilakament relatati), allura studju sħiħ bl-użu ta' dożi fi tlett livelli għandu mnejn ikunu ikkonsidrat bħala mhux meħtieġ. L-isposizzjoni umana mistennija tista' tindika il-ħtieġa għal-livell ta' doża orali għola li tkun użata fit-test tal-limitu. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma huwa t-teħid man-nifs jew l-applikazzjoni dermali, il-propjetajiet fiżikukimiċi tas-sustanza tat-test ta' spiss jistgħu jindikaw u jillimtaw il-massimu tal-livell attenibbli għall-espożizzjoni (per eżempju, l-applikazzjoni dermali m'għandhiex toħloq tossiċità lokali severa).

1.6.5. **Amministrazzjoni tad-dożi**

Is-sustanza tat-test jew il-mezz normalment huwa amministrat bi intubazzjoni orali. Jekk tkun użata rotta oħra ta' l-amministrazzjoni, min jagħmel it-test għandu jipprovdi ġustifikazzjoni u raġjonar għal dik l-għażla, u modifiki xierqa jistgħu li jkunu meħtieġa (2) (3) (4). Is-sustanza tat-test għandha tkun somministrata bejn wieħed u ieħor fl-istess ħin ta' kull jum.

Id-doża lil annimali individwali għandha normalment tkun ibbażata fuq id-determinazzjoni tal-piż tal-ġisem kif l-aktar riċenti disponibbli. B'dana kollu, attenzjoni għandha tkun eżerċitata meta tkun aġġustata d-doża ma tul l-aħħar parti tremestra tat-tqala. Informazzjoni eżistenti għandha tkun użata għall-għażla tad-doża sabiex tipprevjeni eċċess tat-tossiċità materna. B'dana kollu, jekk eċċess ta' tissiċità jkun innutat fin-nisa ittrattati, dawk l-annimali għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk. Jekk diveri annimali tqal juru sinjali ta' tossiċità eċċessiva, kunsiderazzjoni għandha tingħata għat-terminazzjoni ta' dak il-grupp fid-doża. Jekk is-sustanza tkun somministrata b'ikel sfurzat, dan għandu preferibbilment ikun mogħti bħala doża waħda lill-annimali bl-użu ta' tubu lejn l-istinku jew xi canula ta' l-intubazzjoni xierqa. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux jeċċedi 1 ml/100 g piż tal-ġisem, apparti fil-każ ta' taħlitiet akweji meta 2 ml/100 g piż tal-ġisem jista' jkun użat. Meta jkun użat iż-żejt tal-qamħ-ir-rum, il-volum m'għandux jeċċedi 0,4 ml.100 g piż tal-ġisem. Varjabbilità fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-konċentrazzjonijiet sabiex ikun assigurat volum kostanti matul il-livelli kollha tad-doži.

1.6.6. **Osservazzjoni tan-nisa**

Osservazzjonijiet kliniċi għandhom jitwettqu u jkunu rreġistrati mill-anqas darba kull jum, preferibbilment fl-istess ħin(ijiet) billi jkun ikkonsidrat il-perjodu l-aktar probabbli ta' l-effetti antiċipati ta' wara d-doża. Il-kundizzjoni ta' l-annimali għandha tkun irreġistrata, inkluża l-mortalità, l-għafja tal-mewt, tibdil pertinenti fl-imġieba, u s-sinjali kollha ta' tossiċita barranija.

1.6.7. **Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel**

L-annimali għandhom ikunu miżuna fil-jum 0 tal-ġestazzjoni jew mhux aktar tard mill-jum 3 tal-ġestazzjoni jekk annimali mgħammra skond iż-żmien huma fornuti min fekundament barrani, fl-ewwel jum tad-dpża, mill-anqas kull 3 ijiem matul il-perjodu tad-doża u fil-jum tal-mewt kif skedata.

▼B

Il-konsum ta' l-ikel għandu jkun irreġistrat f'intervalli ta' tlett ijiem u għandu jkun jikkonċidi mal-jiem tad-determinazzjoni tal-piż tal-ġisem.

1.6.8. **Eżaminazzjoni ta' wara l-mewt**

In-nisa għandhom ikunu maqtula jum qabel il-jum mistenni tal-ħlas. Femminili li juri sinjali ta' abort jew ħlas prematur għall-iskeda tal-qatla għandhom ikunu maqtula u suġġetti għal eżaminazzjoni makroskopika bir-reqqa.

Filwaqt tat-terminazzjoni jew tal-mewt matul l-istudju, il-mara tqila għandha tkun eżaminata b'makroskopiki għal xi annormalitajiet strutturali jew tibdilied patoloġiċi. L-evalwazzjoni tan-nisa matul is-sezzjon ċesarja u l-analiżi sussegwenti tal-fetu għandha tkun imwettqa, preferibbilment, mingħajr tagħrif dwar il-grupp tat-trattament, sabiex jitnaqqas il-preġudizzju.

1.6.9. **L-eżami tal-kontenuti uterini**

Immedjetament wara t-terminazzjoni jew malli jkun possibbli wara l-mewt, l-uteri għandhom ikunu mneħħija u l-istat tat-tqala ta' l-annimal aċċertat. L-uteri li jidhru mhux bit-tqala għandhom ikunu aktar eżaminati (eż. bit-tiċpis bis-sulfid ta' l-ammonju għall-annimali gerriema u t-tiċpis Salewski jew b'metodu alternattiv xieraq għall-fniek) sabiex ikun konfermat l-istatus mhux tat-tqala (5).

Uteri tqal jinkludu l-għonq ta' l-uteri għandhom ikunu miżuna. Il-piżijiet ta' l-uteri tqal m'għandhomx ikunu akkwistati minn annimali misjuba mejta waqt l-istudju.

In-numru ta' corpora lutea għandu jkun determinat għall-annimali tqal.

Il-kontenuti ta' l-uteri għandhom ikunu eżaminati għan-numru ta' embrijuni jew imwiet tal-feti jew feti viabbli. Il-grad ta' riassorbazzjoni għandu jkun deskritt sabiex ikun ikkalkolat il-ġin relattiv tal-mewt tal-conceptus (ara s-sezzjoni 1.2).

1.6.10. **L-eżami tal-feti**

Is-sess u l-piż tal-ġisem ta' kull fetu għandhom ikunu determinati.

Kull fetu għandu jkun eżaminat għal tibdiliet esterni (6).

Il-feti għandhom ikunu eżaminati għal tibdiliet skeletali u tal-partijiet rotob (eż. varjazzjonijiet u maformazzjonijiet jew anomaliji) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Kategorizzazzjoni ta' l-alterazzjonijiet tal-feti hija preferibbli imma mhux meħtieġa. Meta ssir il-kategorizzazzjoni, il-kriterja għad-definizzjoni ta' kull kategorija għandha tkun kjarament mistqarra. Attenzjoni partikolari għandha tingħata għall-passaġġ riproduttiv li għandu jkun eżaminat għal sinjali ta' żvilupp mibdul.

Għall-annimali gerriema, madwar nofs kull lott tal-feti għandu jkun ippreparat u eżaminat għal tibdil skeletali. Il-kumplament għandu jkun preparat u eżaminat għal tibdil fil-partijiet rotob, bl-użu ta' metodi aċċettati u xierqa b'sezzjonament serjali jew b'teknina bil-għaqal ta' dissessjoni grossa.

▼B

Għall-annimali mhux gerriema, eż. fniek, il-feti kollha għandhom ikunu eżaminati kemm għall-partijiet rotob u wkoll għal alterazzjonijiet skeletali. L-iġsma ta' dawn il-feti huma evalwati b'dissessjoni galbata għal tibdil fil-partijiet rotob, li jistgħu jinkludu proċeduri għal aktar evalwazzjoni ta' l-istruttura kardijaka interna (25). Ir-rjus ta' nofs il-heti eżaminati b'dan il-mod għandhom ikunu mneħħija u ipproċessati għal evalwazzjoni ta' alterazzjonijiet fil-partijiet rotob (inklużi l-għajnejn, il-moħħ, il-passaġġi nażali u l-ilsien), l-użu ta' metodi normali ta' sezzjonar serjali (26) jew metodu egwalment sensittiv. L-iġsma ta' dawn il-feti u l-kumplament tal-feti intatti għandhom ikunu ipproċessati u eżaminati għal tibdil skeletali, bl-utilizzazzjoni ta' l-istess metodi kif deskritti għall-annimali gerriema.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Id-dettalji għandhom ikunu irrapurati individwalment għan-nisa kif ukoll għall-wild tagħhom u miġbura b'sommarju f'għamla tabulari, li juru għal kull grupp tat-test u għal kull ġenerazzjoni, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew qtil umanitarju, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità kif osservati, inkluż il-ħin ta' meta tkun skoppjat, it-tul ta' żmien, u s-severità ta' xi effetti tossiċi, it-tiġ ta' l-osservazzjonijiet ta' l-embrijuni/feti, u l-informazzjoni l-oħra kollha dwar it-traabi l-oħrajn.

Riżultati numeriċi għandhom ikun evalwati b'metodu statistiku xieraq bl-użu tal-grupp ta' wild bħala unità tad-dettalji għall-analiżi. Metodu statistiku ġeneralment aċċettabbli għandu jkun użat, il-metodi statistiċi għandhom ikunu magħżula bħala parti mid-disinn għall-istudju u għandhom ikunu ġġustifikati. L-informazzjoni mill-annimali li jmutu qabel il-qtil skedat għandha wkol tkun irrapurtata. Dik l-informazzjoni tista' tkun inkluża fil-mezzi tal-grupp meta relevanti. Relevanza mid-dettalji akkwistati minn tali annimali, u għalhekk l-inklużjoni jew l-esklużjoni minn xi mess ta' grupp(i), għandha tkun iġġustifikata u iġġudikata fuq bażi individwali.

2.2. EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Is-sejbiet ta' l-istudju tat-Tossiċità fl-Iżvilupp Prenatali għandhom ikunu evalwati f'termini ta' l-effetti osservati. L-evalwazzjoni għandha tinkludi din l-informazzjoni li ġejja:

— riżultati tat-test materni u tal-embriju/fetu, inkluża l-avalwazzjoni tar-relazzjoni, jew tan-nuqqas tagħha, bejn l-espożizzjoni ta' l-annimali għas-sustanza tat-test u l-inċidenza u s-severità tas-sejbiet kollha;

— ktiterja użata għall-kategorizzazzjoni esterna tal-fetu, il-partijiet rotob, u l-alterazzjonijiet skeletali, jekk il-kategorizzazzjoni tkun seħħet;

▼B

— meta xieraq, id-dettalji stpriċi tal-kontroll sabiex iqawwu l-interpretazzjoni tar-riżultati ta' l-istidju;

— in-numri użati fil-kalkolu tal-persentaġġi kollha jew ta' l-indiċi;

— analiżi statistika adekwata tas-sejbiet ta' l-istudju, meta xieraq, li għandha tinkludi informazzjoni suffiċjenti dwar il-metodu ta' l-analiżi, sabiex riveditur/statistiku independenti jkun jista' jevalwa mill-ġdid jew jerġa jibni l-analiżi.

Fi kwalunkwe studju li juri n-nuqqas ta' xi effetti tossiċi, aktar investigazzjonijiet sabiex tkun stabbilita l-assorbazzjoni u l-biodisponabbiltà tas-sustanza tat-test għandhom ikunu meqjusa.

2.3 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Studju tat-tossiċità fl-iżvilupp prenatali jkun jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' espożizzjoni repetuta lejn sustanza matul it-tqala, fuq in-nisa, u l-iżvilupp intra-utru tal-wild tagħhom. Ir-riżultati ta' l-istudju għandhom ikunu interpretatai b'konnessjoni mas-sejbier mill-istudji subkroniku, riproduttivi, tossikokinetiċi u studji oħrajn. La darba l-enfasi tkun kemm fuq it-tossiċita enerali f'termini ta' tossiċita materna u wkoll fuq it-tossiċità fl-iżvilupp fil-għan finali, ir-riżultati ta' l-istudju jkunu jippermettu sa ċertu limitu għal diskriminazzjoni bejn l-effetti ta' l-iżvilupp li jseħħu fin-nuqqas ta' tossiċità ġenerali u dawk li huma imdaħħla biss f'livelli li huma wkoll tossiċi għall-annimal matern (27).

3. RAPPORTAĠĠ

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni speċifika li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;

— l-identifikazzjoni, inklud in-numru CAS jekk magħruf/stabbilit;

— purità.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

— speċje u t-tipi użati;

— in-numru u l-età ta' l-annimali;

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;

— dettalji dwar is-sustanza tat-test, fomulazzjoni/preparazzjoni tad-dieta, Il-konċentrazzjoni akkwistata, l-istabbilità u l-omoġenità tal-preparazzjoni;

▼B

— dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-konċentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali 9mg/kg il-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— kundizzjonijiet ambjentali;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Riżultati:

Dettalji tar-reazzjoni tossika materna bid-doża, li tinkludi, imma mhux limitata għal-:

— in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li jkunu baqgħu ħajjin, in-numru ta' nisa tqal, u n-numru ta' aborti, in-numru ta' annimali li jweldu kmieni;

— il-jum tal-mewt matul l-istudju jew jekk l-annimali jkunux baqgħu ħajjin sakem maqtula;

— dettalji mill-annimali li ma jkunux baqgħu ħajjin tal-qtil skedat għandu jkun irrapurtat imam mhux inkluż fil-paraguni statisticċi inter-grupp;

— il-jum ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal annormali kliniku u l-korsa sussegwenti tiegħu;

— il-piż tal-ġisem, tibdil fil-piż tal-ġisem u l-piż ta' l-utru bil-ħobla, inkluż, b'mod voluntarju, it-tibdil fil-piż tal-ġiesm korreġut għall-piż ta' l-utru bil-ħobla;

— il-konsum ta' l-ikel u, jekk imkejjel, il-konsum ta' l-ilma;

— is-sejbiet tan-nekopsija, inkluż il-piż ta' l-utru;

— NOAEL valuri għall-effetti materni u ta' l-iżvilupp għandhom ikunu irraportati.

L-għanijiet finali ta' l-iżvilupp bid-doża għal grupp ta' frieħ bl-impjanti, inklużi:

— in-numru ta' corpora lutea;

— in-numru ta' implantazzjonijiet, in-numru u l-persentaġġ ta' feti ħajjin u mejta u r- reassorbazzjonijiet;

— in-numru l-persentaġġ ta' telf pre- u post-implantazzjoni.

L-għanijiet finali ta' l-iżvilupp bid-doża għal grupp ta' frieħ b'feti ħajjin, inklużi:

— in-numru u l-persentaġġ ta' frieħ ħajjin;

— relattività tas-sess;

— il-piż tal-ġisem tal-fetu, preferibbilment bis-sess u bis-sessi flimkien;

— alterazzjonijiet esterni, partijiet rotob, u malformazzjoni skeletali u alterazzjoni relevanti oħrajn;

— kriterja għall-kategorizzazzjoni jekk xierqa;

▼B

— in-numru totali u l-persentaġġ ta' feti u frieħ b'xi alterazzjoni esterna, partijiet rotob jew skeletali, kif ukoll it-tipi u l-inċidenzi ta' anomaliji individwali u alterazzjonijiet oħrajn relevanti.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9;:398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung*. 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.'

▼M4

B.32. **STUDJI DWAR IL-KARĊINOĠENIĊITÀ**

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 451 (2009) tal-OECD. It-TG 451 oriġinali dwar Studji dwar il-Karċinoġeniċità kienet adottata fl-1981. L-iżvilupp ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32 rivedut tqis li kien meħtieġ biex jirrifletti żviluppi reċenti fil-qasam tat-trattament xieraq tal-annimali u ta' rekwiżiti regolatorji (2) (3) (4) (5) (6). L-aġġornament ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32 twettaq flimkien ma' reviżjonijiet tal-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness: Studji dwar tossiċità kronika, u tal-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness: Studji dwar Tossiċità Kronika Konġunta\Karċinoġeniċità, u bil-għan li jinkiseb tagħrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jingħataw aktar dettalji dwar għażla ta' doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32 huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgħa ta' kimiċi, inklużi pestiċidi u kimiċi industrijali. Għandu jkun innotat iżda li xi dettalji u rekwiżiti jistgħu jkunu differenti għal farmaċewtiċi (ara l-Gwida SIB tal-Konferenza Internazzjonali għall-Armonizzazzjoni (ICH) dwar Ittestjar għall-Karċinoġeniċità ta' Farmaċewtiċi).

2. Il-maġġoranza tal-istudji dwar il-karċinoġeniċità isiru fi speċijiet ta' rodituri, u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, maħsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu meħtieġa fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, il-prinċipji u l-proċeduri li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar flimkien ma' dawk li l-profil tagħhom jinsab fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (6), għandhom ikunu applikati, b'modifiki xierqa. Gwida ulterjuri hija disponibbli fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD dwar it-Tfassil u t-Twettiq ta' Studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (7).

3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar il-Karċinoġeniċità huma orali, dermali u ta' inalazzjoni. L-għażla tar-rotta ta' amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tal-kimika għall-ittestjar u mir-rotta predominanti ta' espożizzjoni umana. Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' rotta ta' espożizzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

4. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiffoka fuq espożizzjoni permezz tar-rotta orali, ir-rotta li komunement l-aktar li tintuża fi studji dwar il-karċinoġeniċità. Filwaqt li studji dwar il-Karċinoġeniċità li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotot dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu meħtieġa għall-valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħħa tal-bniedem u/jew jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji, iż-żewġ rotot ta' espożizzjoni jinvolvu kumplessità teknika konsiderevoli. Studji bħal dawn ikun jeħtiġilhom jitfasslu abbażi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karċinoġeniċità b'amministrazzjoni orali jista' jifforma l-bażi ta' protokoll għal studji dwar inalazzjoni u/jew dermali, fir-rigward ta' rakkomandazzjonijiet għal perjodi ta' trattament, parametri kliniċi u patoloġiċi, eċċ. Hemm gwida tal-OECD dwar l-amministrazzjoni ta' kimiċi għall-ittestjar bir-rotot dermali (7) u tal-inalazzjoni (7) (8). Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9) u l-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (10), flimkien mad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar ittestjar ta' inalazzjoni akuta (8), għandhom ikunu kkonsultati b'mod speċifiku fit-tfassil ta' studji għal tul itwal ta' żmien li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta tal-inalazzjoni. Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (11) għandu jkun ikkonsultat fil-każ ta' ttestjar magħmul bir-rotta dermali.

▼M4

5. L-istudju tal-karċinoġeniċità jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalgħu minn espożizzjoni ripetuta għal perjodu li jdum tul il-ħajja kollha tal-ispeċi użata. L-istudju għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tossiċi tal-kimika għall-ittestjar, inkluża karċinoġeniċità potenzjali, u jista' jindika organi mmirati u l-possibbiltà ta' akkumulazzjoni. Jista' jipprovdi stima tal-livell bla effett ħażin osservat għal effetti tossiċi u, fil-każ ta' karċinoġeni mhux ġenotossiċi, għal risponsi għal tumuri, li jistgħu jintużaw biex ikunu stabbiliti kriterji ta' sikurezza għal espożizzjoni umana. Qed issir enfażi wkoll dwar il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi sewwa tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.

6. L-għanijiet ta' studji dwar il-karċinoġeniċità koperti minn dan il-Metodu ta' Ttestjar jinkludu:

— L-identifikazzjoni tal-proprjetajiet karċinoġeniċi ta' kimika għall-ittestjar, li tirriżulta f'żieda fl-inċidenza ta' neoplażmi, żieda fil-proporzjon ta' neoplażmi malinni jew tnaqqis fiż-żmien għad-dehra ta' neoplażmi, mqabbel ma' gruppi ta' kontroll konkurrenti,

— L-identifikazzjoni ta' organu/i mmirat(i) ta' karċinoġeniċità;

— L-identifikazzjoni taż-żmien għad-dehra ta' neoplażmi;

— Karatterizzazzjoni tar-relazzjoni bejn it-tumur u r-reazzjoni għad-doża;

— L-identifikazzjoni ta' livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) jew punt ta' tluq biex tkun stabbilita Doża ta' Riferiment (BMD);

— Estrapolazzjoni ta' effetti karċinoġeniċi għal livelli ta' espożizzjoni umana għal doża baxxa;

— Forniment ta' dejta biex ikunu ttestjati ipoteżijiet dwar modalità ta' azzjoni (2) (7) (12) (13) (14) (15).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

7. Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni ta' karċinoġeniċità potenzjali ta' kimika għall-ittestjar, l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju, biex it-tfassil tal-istudju jiffoka fuq l-ittestjar b'aktar effiċjenza għal potenzjal karċinoġeniku u biex l-użu ta' annimali jkun mill-anqas. Informazzjoni dwar, u konsiderazzjoni tal-modalità ta' azzjoni ta' karċinoġenu suspettat (2) (7) (12) (13) (14) (15) hija partikolarment importanti, minħabba li l-aħjar disinn jista' tkun differenti skont jekk il-kimika għall-ittestjar tkunx karċinoġenu ġenotossiku magħruf jew suspettat. Gwida ulterjuri dwar konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

8. Informazzjoni li għandha tassisti fit-tifsila tal-istudju tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; riżultati ta' kull test tat-tossiċità *in vitro* jew *in vivo*, inklużi testijiet ta' ġenotossiċità; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli, mutaġeniċità/ġenotossiċità, karċinoġeniċità u dejta tossikoloġika oħra dwar kimiċi relatati strutturalment; dejta tossikokinetika disponibbli (doża waħda u wkoll kinetika ta' doża ripetuta meta tkun

▼M4

disponibbli) u dejta derivata minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjonijiet. Valutazzjoni tal-karċinoġeniċità għandha ssir wara li tkun inkisbet informazzjoni inizjali dwar tossiċità minn doża ripetuta għal 28 jum u/jew minn testijiet ta' tossiċità għal 90 jum. Testijiet għal żmien qasir ta' bidu-promozzjoni ta' kanċer jistgħu wkoll jipprovdu informazzjoni utli. Approċċ ta' ttestjar f'fażijiet għall- ittestjar tal-karċinoġeniċità għandu jitqies bħala parti mill-valutazzjoni globali tal-effetti potenzjali ħżiena għas-saħħa ta' kimika partikolari għall-ittestjar (16) (17) (18) (19).

9. Il-metodi ta' statistika l-aktar adatti għall-analiżi ta' riżultati, meqjusin it-tifsila u l-għanijiet sperimentali, għandhom ikunu stabbiliti qabel ma jingħata bidu għall-istudju. Kwistjonijiet li għandhom jitqiesu jinkludu jekk l-istatistika għandhiex tinkludi aġġustament għal sopravivenza, analiżi ta' riskji kumulattivi ta' kanċer relattiv għal kemm iddum is-sopravivenza, analiżi taż-żmien għal tumur u analiżi fil-każ ta' tmiem ħesrem ta' grupp wieħed jew aktar. Gwida dwar l-analiżi xierqa ta' statistika u referenzi ewlenin għal metodi ta' statistika aċċettati internazzjonalment jingħataw fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), u wkoll fid-Dokument ta' Gwida Nru 35 dwar l-analiżi u l-evalwazzjoni ta' studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità (20).

10. Fit-tmexxija ta' studju tal-karċinoġeniċità, il-prinċipji u l-konsiderazzjonijiet ta' gwida li l-profil tagħhom jinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 19 tal-OECD dwar l-għarfien, il-valutazzjoni u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem b'mod uman għal annimali għall-esperimenti użati f'evalwazzjoni tas-sikurezza (21), b'mod partikolari l-paragrafu 62 tiegħu, għandhom ikunu segwiti dejjem. Dan il-paragrafuq jiddikjara li "*Fi studji li jinvolvu dożaġġ ripetut, meta annimal juri sinjali kliniċi li huma progressivi, u jwasslu għal iktar deterjorament fil-kundizzjoni, għandha tittieħed deċiżjoni infurmata dwar jekk l-annimal għandux jinqatel b'mod uman jew le. Id-deċiżjoni għandha tinkludi konsiderazzjoni tal-valur tal-informazzjoni li għandha tinkiseb mill-manutenzjoni kontinwata ta' dak l-annimal fl-istudju, relattiv għall-kundizzjoni ġenerali tiegħu. Jekk tittieħed deċiżjoni biex l-annimal jibqa fit-test, il-frekwenza tal-osservazzjonijiet għandha tiżdied, skont il-bżonn. Jista' jkun possibbli wkoll, mingħajr ma jaffettwa b'mod avvers l-iskop tat-test, li d-dożaġġ jieqaf temporanjament jekk dan ħa jtaffi l-uġigħ jew l-iskumdità, jew li tonqos id-doża tat-test.*"

11. Gwida dettaljata u diskussjoni dwar il-prinċipji ta' għażla ta' doża għal studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità tinsab fi Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), kif ukoll f'żewġ pubblikazzjonijiet tal-Internazzjonali Life Sciences Institute (22) (23). L-istrateġija bażika tal-għażla tad-doża tkun tiddependi mill-għan jew għanijiet primarji tal-istudju (il-paragrafu 6). Fl-għażla ta' livelli xierqa ta' doża, għandu jinkiseb bilanċ bejn tgħarbil ta' perikli min naħa waħda u karatterizzazzjoni ta' risponsi għal dożi baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naħa oħra. Dan huwa partikolarment rilevanti fis-sitwazzjoni fejn ikollu jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness) (paragrafu 12).

12. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness) milli eżekuzzjoni separata ta' studju dwar tossiċità kronika (il-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness) u studju tal-karċinoġeniċità (dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32). It-test konġunt jipprovdi aktar effiċjenza fir-rigward ta' ħin u spejjeż imqabblin ma' meta jsiru żewġ studji separati, mingħajr ħsara għall-kwalità tad-dejta fil-faži kronika jew fil-faži ta' karċinoġeniċità. Iżda għandhom jitqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 11 u 22-25) meta jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness), u huwa rikonoxxut ukoll li jistgħu jkunu meħtieġa studji separati f'ċerti oqfsa regolatorji.

▼M4

13. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'dożi gradwati lil diversi gruppi ta' annimali tat-test għall-parti l-kbira tal-ħajja kollha tagħhom, normalment bir-rotta orali. Ittestjar bl-inalazzjoni jew bir-rotta dermali jista' wkoll ikun adattat. L-annimali jkunu osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità u għall-iżvilupp ta' leżjonijiet neoplastiċi. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimal

15. Dan il-Metodu ta' Ttestjar primarjament ikopri l-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' karċinoġeniċità f'rodituri (paragrafu 2). L-użu ta' speċijiet ta' annimali mhux rodituri jista' jitqies meta dejta disponibbli tissuġġerixxi li jkunu aktar rilevanti għat-tbassir ta' effetti ta' saħħa fil-bnedmin. L-għażla ta' speċi għandha tkun iġġustifikata. L-ispeċi ppreferuta ta' rodituri huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' rodituri, eż. il-ġurdien. Għalkemm l-użu tal-ġurdien f'ittestjar tal-karċinoġeniċità jista' jkollu utilità limitata (24) (25) (26), skont xi programmi regolatorji preżenti l-ittestjar tal-karċinoġeniċità fil-ġurdien għadu meħtieġ sakemm ma jkunx deċiż li studju bħal dan ma jkunx meħtieġ xjentifikament. Firien u ġrieden kienu l-mudelli ppreferuti għall-esperimenti minħabba l-ħajja relattivament qasira tagħhom, l-użu kbir li jsir minnhom fi studji farmakoloġiċi u tossikoloġiċi, is-suxxettibbiltà tagħhom għal induzzjoni ta' tumur u li minnhom hemm razez karatterizzati biżżejjed. Bħala konsegwenza ta' dawn il-karatteristiċi, hemm ammont kbir ta' informazzjoni dwar il-fiżjoloġija u l-patoloġija tagħhom. Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' speċi u razza hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

16. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju tal-karċinoġeniċità għandu preferibbilment isir f'annimali mill-istess razza u sors bħal dawk użati fi studju/i preliminari dwar tossiċità li jdum(u) anqas, għalkemm jekk annimali minn din ir-razza u sors ikunu magħrufa li jippreżentaw problemi biex jinkisbu l-kriterji normalment aċċettati ta' sopravivenza għal studji fit-tul [ara d-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7)], għandha tingħata konsiderazzjoni għall-użu ta' razza ta' annimal li jkollha rata aċċettabbli ta' sopravivenza għall-istudju fit-tul. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal.

Abitazzjoni u għalf

17. L-annimali jistgħu jitqiedu jabitaw individwalment, jew jitqiegħdu f'gaġeġ fi gruppi żgħar tal-istess sess; abitazzjoni għal kull annimal waħdu għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (27) (28) (29). Gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minħabba t-tqegħid ta' gaġeġ. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx 70 % minbarra matul il-ħasil tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. Id-dieta għandha tissodisfa l-ħtiġijiet nutrizzjonali kollha tal-ispeċi ttestjata u l-kontenut ta' kontaminanti tad-dieta, inklużi iżda mhux limitatament għal residwi ta'

▼M4

pestiċidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestroġeni, metalli tqal u mikotossini, li jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultat tat-test, għandu jkun baxx kemm jista' jkun. Informazzjoni analitika dwar il-livelli ta' kontaminanti tan-nutrijent u tad-dieta għandha tkun iġġenerata perjodikament, mill-anqas fil-bidu tal-istudju u meta jkun hemm bidla fil-lott użat, u għandha tkun inkluża fir-rapport finali. Bl-istess mod għandha tkun ipprovduta informazzjoni analitika dwar l-ilma tax-xorb użat fl-istudju. L-għażla ta' dieta tista' tkun influwenzata mill-ħtieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-ħtiġijiet nutrizzjonli tal-annimali meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tar-rotta tad-dieta.

Preparazzjoni tal-annimali

18. Għandhom jintużaw annimali f'saħħithom, li jkunu ġew akklimatizzati għal kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-anqas 7 ijiem li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. Fil-każ ta' rodituri, id-dożaġġ tal-annimali għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara ftim u akklimatazzjoni u preferibbilment qabel mal-annimali jkun għandhom 8 ġimgħat. L-annimali tat-test għandhom ikunu kkaratterizzati fir-rigward ta' speċi, razza, sors, sess, piż u età. Malli jinbeda l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż għal kull sess ta' annimal użat għandha tkun minimali u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju tal-annimali kollha fl-istudju, separatament għal kull sess. L-annimali għandhom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. Wara l-każwalità, m'għandux ikun hemm differenzi sinifikanti fil-piżijiet medji tal-ġisem bejn gruppi f'kull sess. Jekk ikun hemm differenzi sinifikanti ta' statistika, f'dak il-każ il-proċedura ta' każwalità għandha tkun ripetuta, jekk ikun possibbli. Kull annimal għandu jkun assenjat numru ta' identifikazzjoni uniku, u jkun immarkat b'mod permanenti b'dan in-numru b'tatù, b'impjant ta' mikroċipp jew b'metodu ieħor adattat.

PROĊEDURA

Għadd u sess tal-annimali

19. Għandhom jintużaw iż-żewġ sessi. Għandu jintuża għadd suffiċjenti ta' annimali biex evalwazzjoni bijoloġika u ta' statistika bir-reqqa tkun possibbli. Kull grupp ta' doża u grupp ta' kontroll konkurrenti għandhom, għalhekk, ikun fihom mill-anqas 50 annimal taż-żewġ sessi. Skont x'ikun l-għan tal-istudju, jista' jkun possibbli li tiżdied il-qawwa ta' statistika tal-istimi ewlenin billi annimali jkunu allokati b'mod differenzjali u mhux indaqs fil-gruppi varji ta' doża, b'aktar minn 50 annimal fil-gruppi ta' doża baxxa; eż. biex ikun stmat il-potenzjal karċinoġeniku f'doži baxxi. Iżda għandu jkun irrikonoxxut li żieda moderata fid-daqs ta' grupp għandha tipprovdi relattivament ftit żieda fil-qawwa ta' statistika tal-istudju. Aktar informazzjoni dwar tfassil ta' statistika tal-istudju u għażla ta' livelli ta' doża biex jintlaħaq il-massimu tal-qawwa ta' statistika hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

Provvediment għal qatliet interim u gruppi satellitarji (sentinelli)

20. L-istudju jista' jipprovdi għal qatliet interim, eż. fit-12-il xahar, biex jagħti informazzjoni dwar il-progressjoni ta' bidliet neoplastiċi u informazzjoni mekkanistika, jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Fejn diġà jkun hemm informazzjoni bħal din mill-istudji preċedenti ta' tossiċità ta' doża ripetuta dwar il-kimika għall-ittestjar, qatliet interim jistgħu ma jkunux xjentifikament ġustifikati. Jekk qatliet interim ikunu inklużi fit-tifsila tal-istudju, l-għadd ta' annimali f'kull grupp ta' doża skedat għal qatla interim normalment ikun ta' 10 annimali għal kull sess, u l-għadd totali ta' annimali inklużi fit-tifsila tal-istudju għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimali li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Jista' wkoll ikun inkluż grupp addizzjonali ta' annimali sentinelli (tipikament 5 annimali għal kull sess) għall-monitoraġġ tal-istatus ta' mard, jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju (30). Gwida ulterjuri hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

▼M4

Gruppi ta' doži u dożaġġ

21. Gwida dwar l-aspetti kollha ta' għażla ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Mill-anqas għandhom jintużaw tliet livelli ta' doża u kontroll konkurrenti. Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

22. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex ikunu identifikati l-organi prinċipali u l-effetti tossiċi filwaqt li jkunu evitati tbatija, tossiċità severa, morbiditàjew mewt. Filwaqt li jitqiesu l-fatturi li l-profil tagħhom jinsab fil-paragrafu 23 hawn taħt, normalment għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex jislet evidenza ta' tossiċità, kif ikun jidher, pereżempju, minn tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-ġisem (madwar 10 %). Iżda, skont x'ikunu l-għanijiet tal-istudju (ara l-paragrafu 6), tista' *tintgħażel l-ogħla doża anqas mid-doża* li tipprovdi evidenza ta' tossiċità, *eż. jekk doża tislet effett avvers ta' tħassib iżda li madankollu jkollha ftit impatt fuq il-ħajja jew il-piż tal-ġisem.*

23. Jistgħu jintgħażlu livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża biex ikunu stabbiliti doża-rispons u, skont il-modalità ta' azzjoni tal-kimika għall-ittestjar, NOAEL jew riżultat maħsub ieħor tal-istudju, eż. BMD (ara l-paragrafu 25) fil-livell ta' doża l-aktar baxx. Fatturi li għandhom jitqiesu fl-għoti ta' doži aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-doži li fihom jistgħu jseħħu bidliet importanti fil-metaboliżmu jew il-modalità ta' azzjoni tossika, fejn ikun mistenni limitu, jew fejn ikun mistenni punt ta' tluq għal estrapolazzjoni ta' doża baxxa.

24. L-ispazjar magħżul ta' livelli ta' doża jkun jiddependi mill-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar, u ma jistax ikun preskritt f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, iżda intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss jipprovdu prestazzjoni tajba ta' test biex ikunu stabbiliti l-livelli minn fuq għal isfel ta' doži, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' test sikwit hija preferibbli mill-użu ta' intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' madwar 6-10) bejn dożaġġi. B'mod ġenerali, l-użu ta' fatturi akbar minn 10 għandu jkun evitat, u għandu jkun iġġustifikata jekk ikun applikat.

25. Kif diskuss ulterjorment fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), punti li għandhom jitqiesu fl-għażla ta' doża jinkludu:

— Nonlinearitajiet magħrufin jew suspettati jew punti ta' infezzjoni fid-doża-rispons;

— Tossikokinetika u firxa ta' doži fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn doži esterni u interni jseħħu jew ma jseħħux;

— Leżjonijiet prekursuri, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;

— Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta' modalità ta' azzjoni, bħal doži li fihom tibda tfaqqa' ċ-ċitotossiċità, livelli ta' ormoni jitħawdu, mekkaniżmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;

▼M4

— Reġjuni tal-kurva ta’ doża-rispons fejn tkun meħtieġa stima partikolarment robusta, eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;

— Konsiderazzjoni ta’ livelli antiċipati ta’ espożizzjoni umana.

26. Il-grupp ta’ kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta’ kontroll ta’ vejjikoli jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Ħlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta’ kontroll għandhom ikunu maniġġati b’mod identiku bħal dawk fil-gruppi tat-test. Jekk jintuża vejjikolu, il-grupp ta’ kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-ogħla volum użat fost il-gruppi ta’ doża. Jekk kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, u tikkawża li jittieħed anqas ikel tad-dieta b’mod sinifikanti minħabba dieta b’anqas palat, grupp ta’ kontroll addizzjonali ta’ tmigħ lil pari jista’ jkun utli biex iservi ta’ kontroll aktar adattat.

Preparazzjoni ta’ dożi u amministrazzjoni ta’ kimika għall-ittestjar

27. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata oralment, permezz tad-dieta jew ilma tax-xorb, jew b’gavage. Informazzjoni addizzjonali dwar rotot u metodi ta’ amministrazzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (7). Ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni jkunu jiddependi mill-għan tal-istudju, il-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mid-disponibbiltà bijoloġika tagħha u mill-metodu ta’ espożizzjoni umana. Għandu jkun ipprovdut motiv għar-rotta magħżula u għall-metodu ta’ amministrazzjoni. Fl-interess ta’ trattament xieraq tal-annimali, gavage orali għandu normalment jintgħażel biss għal dawk l-aġenti, li għalihom din ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni raġonevolment jirrappreżentaw espożizzjoni potenzjali umana (eż. farmaċewtiċi). Għal kimiċi ta’ dieta jew ambjentali inklużi pestiċidi, l-amministrazzjoni tipikament issir permezz tad-dieta jew b’ilma tax-xorb. Iżda, għal xi xenarji, eż. espożizzjoni okkupazzjonali, amministrazzjoni permezz ta’ rotot oħra tista’ tkun aktar adattata.

28. Meta jkun meħtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinħall jew tiġi sospiża f’vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u addittivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprjetajiet kimiċi tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u effetti fuq l-ikel jew fuq il-konsum tal-ilma jew fuq l-istat nutrizzjonali tal-annimali. Huwa rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jitqies l-użu ta’ soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, u wara titqies soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b’soluzzjoni f’vejjikoli oħra. Għal vejjikoli oħra minbarra ilma, il-karatteristiċi tossiċi tal-vejjikolu għandhom ikunu magħrufa. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar l-istabbiltà tal-kimika għall-ittestjar u l-omoġeneità ta’ soluzzjonijiet ta’ dożaġġ jew dieti (kif jixraq) skont il-kundizzjonijiet ta’ amministrazzjoni (eż. dieta).

29. Għall-kimiċi amministrati permezz tad-dieta jew l-ilma tax-xorb, huwa importanti jkun żgurat li l-kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Fi studji fit-tul dwar tossiċità bl-użu ta’ amministrazzjoni ta’ dieta, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-għalf m’għandhiex tkun aktar ‘il fuq mil-limitu ta’ 5 % tad-dieta totali, biex ikunu evitati żbilanċi nutrizzjonali. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw jew konċentrazzjoni kostanti ta’ dieta (mg/kg dieta jew ppm) jew livell wieħed kostanti ta’ doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgħa. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼M4

30. Fil-każ ta' amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-ġimgħa), normalment għal perjodu ta' 24 xahar għal rodituri (ara wkoll il-paragrafu 32). Kull reġim ieħor ta' dożaġġ, eż. ħamest ijiem fil-ġimgħa, jeħtieġlu jkun iġġustifikat. Fil-każ ta' amministrazzjoni dermali, annimali jkunu normalment ittrattati bil-kimika għall-ittestjar għal mill-anqas 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, kif speċifikat fil-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (11), għal perjodu ta' 24 xahar. Espożizzjoni bir-rotta tal-inalazzjoni ssir għal 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, iżda tista' tintuża wkoll espożizzjoni għal 5 ijiem fil-ġimgħa, jekk dan ikun ġustifikat. Il-perjodu ta' espożizzjoni jkun normalment għal perjodu ta' 24 xahar. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta tintuża espożizzjoni li ddum anqas minn 6 sigħat kuljum. Ara wkoll il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9).

31. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b'gavage lill-annimali, dan għandu jsir billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta' intubazzjoni adattat, f'ħinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża waħda darba kuljum; fejn pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista' jkun possibbli li tinżamm ir-rata ta' doża kuljum billi din tkun amministrata bħala doża maqsuma (darbtejn kuljum). Il-volum massimu ta' likwidu li jkun jista' jiġi amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum għandu jinżamm baxx daqs kemm ikun prattikabbli, u normalment m'għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem għal rodituri (31). Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistgħu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jeħtiġilhom jiġu dilwiti biex ikunu evitati effetti lokali severi. Ittestjar f'konċentrazzjonijiet li x'aktarx ikunu korrużivi jew irritanti għas-sistema gastrointestinali għandu jkun evitat.

Durata tal-istudju

32. Studju normalment idum 24 xahar għal rodituri, li jirrappreżenta l-maġġoranza tal-ħajja kollha normali tal-annimali li għandhom jintużaw. Jistgħu jintużaw studji aqsar jew itwal, skont it-tul tal-ħajja tar-razza tal-ispeċijiet ta' annimali fl-istudju, iżda għandhom ikunu ġġustifikati. Għal razez speċifiċi ta' ġrieden, eż. AKR/J, C3H/J jew C57BL/6J durata ta' 18-il xahar tista' tkun aktar adattata. Dan li ġej jipprovdi xi gwida dwar durata, tmiem tal-istudju u sopravivenza; gwida ulterjuri, inkluża konsiderazzjoni ta' aċċettabbiltà ta' karċinoġeniċità negattiva relattiva għal sopravivenza fl-istudju, hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD dwar it-Tfassil u t-Twettiq ta' Studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (7).

— It-tmiem tal-istudju għandu jitqies meta l-għadd ta' superstiti fil-gruppi ta' doża aktar baxxa jew fil-grupp ta' kontroll jinżel taħt il-25 fil-mija.

— Fil-każ fejn il-grupp ta' doża għolja biss imut ħesrem minħabba tossiċità, dan m'għandux jikkawża t-tmiem tal-istudju.

— Is-sopravivenza ta' kull sess għandha titqies separatament.

— L-istudju m'għandux ikun estiż lil hinn mill-punt meta d-dejta disponibbli mill-istudju ma tkunx aktar suffiċjenti biex tkun tista' ssir evalwazzjoni valida statistikament.

▼M4

OSSERVAZZJONIJIET

33. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbidità jew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u fit-tmiem ta' kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. L-annimali għandhom addizzjonalment ikunu eżaminati darba kuljum għal sinjali speċifiċi ta' rilevanza tossikoloġika, filwaqt li jitqies il-perjodu massimu ta' effetti antiċipati wara dożaġġ fil-każ ta' amministrazzjoni b'gavage. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lil żvilupp ta' tumuri; u għandu jiġi rreġistrat iż-żmien meta jfaqqgħu tumuri, post, dimensjonijiet, dehra u progressjoni ta' kull tumur li jkun jidher sewwa u jista' jintmess.

Piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma u effiċjenza fl-ikel

34. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejlijiet ta' konsum ta' ikel u ta' effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata f'ilma tax-xorb. Għandhom jitqiesu wkoll kejlijiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

Ematoloġija, bijokimika klinika u kejlijiet oħra

35. Biex jintlaħaq il-massimu tal-informazzjoni miksuba mill-istudju, speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni, ikunu jistgħu jittieħdu kampjuni tad-demm għal ematoloġija u bijokimika klinika, u dan fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Analiżi tal-awrina jista' wkoll ikun adattat. Gwida ulterjuri dwar il-valur ta' teħid ta' kampjuni bħal dawn bħala parti minn studju tal-karċinoġeniċità hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Jekk jitqies li jkun adattat, teħid ta' kampjuni tad-demm għal determinazzjonijiet ematoloġiċi u ta' kimika klinika u għal analiżi tal-awrina jistgħu jsiru bħala parti minn qatla interim (paragrafu 20) u fi tmiem l-istudju fuq minimu ta' 10 annimali għal kull sess għal kull grupp. Għandhom jittieħdu kampjuni tad-demm minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardijaku jew mis-sinus retroorbitali b'anestesija, u jinħażnu, jekk applikabbli, f'kundizzjonijiet xierqa. Jistgħu wkoll ikunu ppreparati tiċpisiet għal eżami, partikolarment jekk ikun jidher li l-mudullun tal-għadam ikun l-organu mmirat, għalkemm il-valur ta' eżami bħal dan għall-valutazzjoni ta' potenzjal karċinoġeniku/onkoġeniku huwa dubjuż (32).

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

36. L-annimali kollha fl-istudju ħlief annimali sentinelli (ara l-paragrafu 20) u annimali satellitarji oħra għandhom ikunu ssoġġettati għall-awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. L-annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra jista' jkun jeħtiġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Piżijiet ta' organi ma jkunux normalment parti minn studju karċinoġenesi, minħabba li bidliet ġerjatriċi u, fi stadji ta' wara, l-iżvilupp ta' tumuri tħawwad l-utilità ta' dejta dwar piżijiet ta' organi. Huma jistgħu, iżda, ikunu importanti biex jittieħed piż ta' valutazzjoni ta' evidenza u speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni. Jekk ma jkunux parti minn studju satellitarju, huma għandhom jinġabru mhux aktar tard minn sena wara l-bidu tal-istudju.

▼M4

37. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (33) (tessuti f'parenteżi kwadri huma fakultattivi):

il-leżjonijiet kbar kollha	qalb	frixa	stonku (il-parti quddimija tal-istonku, stonku glandolari)
glandola adrenali	ileu	glandola tal-paratirojde	[snien]
aorta	jejunum	nerv periferali	testikoli
moħħ (inklużi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/meżoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugħ (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]
glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-ħoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inklużi mnieħer, turbinati u sinus paranażali]	ġilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtoraċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vaġina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-għadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-għadam
Glandola ta' Harder			

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermali ta' amministrazzjoni, il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandhom ikunu ppreservati, u t-teħid ta' kampjuni speċifiċi u l-preservazzjoni tal-ġilda mis-sit ta' applikazzjoni huma essenzjali. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitoli B.8 u B.29 ta' dan l-Anness. Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

▼M4

Istopatoloġija

38. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (33). Il-minimu ta' tessuti eżaminati għandu jkun:

— It-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;

— It-tessuti kollha ta' annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;

— It-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi inklużi tumuri;

— Meta bidliet istopatoloġiċi relatati ma' trattament ikunu osservati fil-grupp ta' doża għolja, dawk l-istess tessuti għandhom ikunu eżaminati mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;

— Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

39. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. Addizzjonalment, id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali fil-bidu tat-test, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kull mewta jew qatla b'mod uman, l-għadd ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż iż-żmien meta jibdew ifaqqgħu, durata u severità ta' kull effett tossiku, l-għadd ta' annimali li juru leżjonijiet, it-tip ta' leżjonijiet u l-perċentwali tal-annimali li juru kull tip ta' leżjoni. Tabelli ta' sommarji ta' dejta għandhom jipprovdu l-mezzi u d-devjazzjonijiet standard (għal dejta ta' test kontinwu) ta' annimali li juru effetti tossiċi jew leżjonijiet, minbarra l-gradazzjoni tal-leżjonijiet.

40. Dejta storika ta' kontroll tista' tkun siewja fl-interpretazzjoni tar-riżultati tal-istudju, eż. fil-każ meta jkun hemm indikazzjonijiet li d-dejta pprovduta mill-kontrolli konkurrenti tkun sostanzjalment diversa meta mqabbla ma' dejta reċenti minn annimali ta' kontroll mill-istess faċilità/kolonja tat-test. Dejta storika ta' kontroll, jekk tkun evalwata, għandha tkun sottomessa mill-istess laboratorju u tkun tirrelata ma' annimali tal-istess età u razza ġġenerati matul il-ħames snin li jkunu ġew qabel l-istudju inkwistjoni.

41. Meta jkunu applikabbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-metodi ta' statistika u d-dejta li jkollha tiġi analizzata għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju (il-paragrafu 9). L-għażla għandha tipprovdi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun meħtieġ.

Rapport tat-test

42. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-Ittestjar:

— natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni;

▼M4

— sors tal-kimika;

— numru tal-lott;

— ċertifikat tal-analiżi tal-kimika;

Vejjikolu (fejn xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

Annimali tat-test:

— speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;

— għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;

— sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;

— piżijiet individwali ta' kull annimal fil-bidu tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test:

— motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;

— meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;

— dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta.

— dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;

— rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieħer jew il-ġisem kollu;

— dożi attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), u fattur ta' konverżjoni minn konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (mg/kg jew ppm) ta' dieta/ilma tax-xorb għad-doża attwali, jekk applikabbli;

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Riżultati (għandhom ikunu ppreżentati sommarju ta' dejta tabulata u dejta dwar annimali individwali):

Ġenerali

— dejta dwar sopravivenza;

— piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— konsum ta' ikel, kalkulazzjonijiet ta' effiċjenza fl-ikel, jekk ikunu saru, u konsum tal-ilma, jekk applikabbli;

— dejta tossikokinetika (jekk disponibbli);

— oftalmoskopija (jekk disponibbli);

— ematoloġija (jekk disponibbli);

— kimika klinika (jekk disponibbli);

▼M4

Sejbiet kliniċi

— Sinjali ta' tossiċità;

— Inċidenza (u, jekk bil-punti, severità) ta' kull anormalità;

— Natura, severità, u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk hux tranżitorji jew permanenti);

Dejta dwar l-awtopsja

— Piż terminali tal-ġisem;

— Piżijiet ta' organi u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli;

— Sejbiet minn awtopsji; inċidenza u severità ta' anormalitajiet;

Istopatoloġija

— Sejbiet istopatoloġiċi mhux neoplastiċi;

— Sejbiet istopatoloġiċi neoplastiċi;

— Korrelazzjoni bejn sejbiet makroskopiċi u mikroskopiċi;

— Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi kollha relatati ma' trattament inklużi gradazzjonijiet ta' severità;

— Rapport ta' kull evalwazzjoni bejn il-pari dwar is-slides;

Trattament ta' statistika ta' riżultati, kif jixraq

Diskussjoni dwar ir-riżultati inklużi

— Diskussjoni dwar kull approċċ ta' mudellar;

— Relazzjonijiet ta' doża-rispons;

— Dejta storika ta' kontroll;

— Qies ta' kull informazzjoni dwar modalità ta' azzjoni;

— Determinazzjoni ta' BMD, NOAEL jew LOAEL

— Rilevanza għall-bnedmin;

Konklużjonijiet

LETTERATURA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

(6) Il-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali dwar Doża Ripetuta għal 90 Jum ta' Test ta' Subtossiċità Kronika Orali f'Annimali Mhux Rodituri.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subakuta Studju ta' 28 Jum.

(10) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subkronika Studju ta' 90 Jum.

(11) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossiċità (Dermali) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittejstjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

B. 33. **STUDJI KONĠUNTI DWAR TOSSIĊITÀ KRONIKA/KARĊINOĠENIĊITÀ**

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 453 (2009) tal-OECD. It-TG 453 oriġinali kienet adottata fl-1981. L-iżvilupp ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.33 aġġornat tqies li kien meħtieġ biex jirrifletti żviluppi reċenti fil-qasam tat-trattament xieraq tal-annimali u ta' rekwiżiti regolatorji (1) (2) (3) (4) (5). L-aġġornament ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.33 twettaq flimkien ma' reviżjonijiet tal-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness: Studji dwar il-Karċinoġeniċità, u tal-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness, studji dwar Tossiċità Kronika, bil-għan li jinkiseb tagħrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jingħataw aktar dettalji dwar għażla ta' doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgħa ta' kimiċi, inklużi pestiċidi u kimiċi industrijali. Għandu jkun innotat iżda li xi dettalji u rekwiżiti jistgħu jkunu differenti għal farmaċewtiċi [ara l-Gwida SIB tal-Konferenza Internazzjonali għall-Armonizzazzjoni (ICH) dwar Ittestjar għall-Karċinoġeniċità ta' Farmaċewtiċi].

2. Il-maġġoranza tal-istudji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità jsiru fi speċijiet ta' rodituri u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, maħsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu meħtieġa fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, il-prinċipji u l-proċeduri li tagħhom jingħata profil jistgħu wkoll ikunu applikati, b'modifiki xierqa, flimkien ma' dawk li l-profil tagħhom jinsab fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (6), skont il-profil tagħhom fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 tal-OECD dwar it-Tfassil u t-Twettiq ta' Studji dwar Tossiċità Kronika u Karċinoġeniċità (7).

3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar tossiċità kronika/karċinoġeniċità huma orali, dermali u ta' inalazzjoni. L-għażla tar-rotta ta' amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tal-kimika għall-ittestjar u mir-rotta predominanti ta' espożizzjoni umana. Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' rotta ta' espożizzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

4. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiffoka fuq espożizzjoni permezz tar-rotta orali, ir-rotta li komunement l-aktar li tintuża fi studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità. Filwaqt li studji fit-tul li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotot dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu meħtieġa għall-valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħħa tal-bniedem u/jew jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji, iż-żewġ rotot ta' espożizzjoni jinvolvu kumplessità teknika konsiderevoli. Studji bħal dawn ikun jeħtiġilhom jitfasslu abbażi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità b'amministrazzjoni orali jista' jifforma l-bażi ta' protokoll għal studji dwar inalazzjoni u/jew dermali, fir-rigward ta' rakkomandazzjonijiet għal perjodi ta' trattament, parametri kliniċi u patoloġiċi, eċċ. Hemm gwida tal-OECD dwar l-amministrazzjoni ta' kimiċi għall-ittestjar bir-rotot tal-inalazzjoni (7) (8) u dermali (7). Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9) u l-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (10), flimkien mad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar ittestjar ta' inalazzjoni akuta (8), għandhom ikunu kkonsultati b'mod speċifiku fit-tfassil ta' studji għal tul itwal ta' żmien li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta tal-inalazzjoni. Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (11) għandu jkun ikkonsultat fil-każ ta' ttestjar magħmul bir-rotta dermali.

▼M4

5. L-istudju konġunt tat-tossiċità kronika/karċinoġeniċità jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalgħu minn espożizzjoni ripetuta għal perjodu li jdum tul il-ħajja kollha tal-ispeċi użata. L-istudju għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tossiċi tal-kimika għall-ittestjar, inkluża karċinoġeniċità potenzjali, jindika organi mmirati u l-possibbiltà ta' akkumulazzjoni. Jista' jipprovdi stima tal-livell bla effett ħażin osservat għal effetti tossiċi u, fil-każ ta' karċinoġeni mhux ġenotossiċi, għal risponsi għal tumuri, li jistgħu jintużaw biex ikunu stabbiliti kriterji ta' sikurezza għal espożizzjoni umana. Qed issir enfażi wkoll dwar il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi sewwa tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.

6. L-għanijiet ta' studji dwar tossiċità kronika/karċinoġeniċità koperti minn dan il-Metodu ta' Ttestjar jinkludu:

— L-identifikazzjoni tal-proprjetajiet karċinoġeniċi ta' kimika għall-ittestjar, li tirriżulta f'żieda fl-inċidenza ta' neoplażmi, żieda fil-proporzjon ta' neoplażmi malinni jew tnaqqis fiż-żmien għad-dehra ta' neoplażmi, mqabbel ma' gruppi ta' kontroll konkurrenti,

— Identifikazzjoni taż-żmien għad-dehra ta' neoplażmi;

— Identifikazzjoni tat-tossiċità kronika tal-kimika għall-ittestjar;

— Identifikazzjoni ta' organu/i mmirat(i) ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità,

— Karatterizzazzjoni tar-relazzjoni doża-rispons,

— Identifikazzjoni ta' livell bla effett ħażin osservat (NOAEL) jew punt ta' tluq biex tkun stabbilita Doża ta' Riferiment (BMD);

— Estrapolazzjoni tal-effetti karċinoġeniċi għal livelli ta' espożizzjoni umana għal doża baxxa,

— Tbassir ta' effetti ta' tossiċità kronika f'livelli ta' espożizzjoni umana,

— Forniment ta' dejta biex ikunu ttestjati ipoteżijiet dwar modalità ta' azzjoni (2) (7) (12) (13) (14) (15).

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

7. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karċinoġeniċità potenzjali u tossiċità kronika ta' kimika għall-ittestjar, l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar għandha titqies mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju, biex it-tfassil tal-istudju jiffoka fuq l-ittestjar b'aktar effiċjenza għall-proprjetajiet tossikoloġiċi tagħha u biex l-użu ta' annimali jkun mill-anqas. Informazzjoni dwar, u konsiderazzjoni tal-modalità ta' azzjoni ta' karċinoġenu suspettat (2) (7) (12) (13) (14) (15) hija partikolarment importanti, minħabba li l-aħjar disinn jista' tkun differenti skont jekk il-kimika għall-ittestjar tkunx karċinoġenu ġenotossiku magħruf jew suspettat. Gwida ulterjuri dwar konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

8. Informazzjoni li għandha tassisti fit-tifsila tal-istudju tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; kwalunkwe informazzjoni dwar il-modalità ta' azzjoni; riżultati ta' kull test tat-tossiċità *in vitro* jew *in vivo*, inklużi testijiet ta' ġenotossiċità; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli, mutaġeniċità/ġenotossiċità, karċinoġeniċità u dejta tossikoloġika oħra dwar kimiċi relatati strutturalment; dejta tossikokinetika disponibbli (doża waħda u wkoll kinetika ta' doża ripetuta meta tkun disponibbli) u dejta derivata

▼**M4**

minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjonijiet. Id-determinazzjoni ta' tossiċità kronika/karċinoġeniċità għandha ssir biss wara li tkun inkisbet informazzjoni inizjali dwar tossiċità minn doża ripetuta għal 28 jum u/jew minn testijiet ta' tossiċità għal 90 jum. Testijiet għal żmien qasir ta' bidu-promozzjoni ta' kanċer jistgħu wkoll jipprovdu informazzjoni utli. Approċċ ta' ttestjar f'fażijiet għall-ittestjar tal-karċinoġeniċità għandu jitqies bħala parti mill-valutazzjoni globali tal-effetti potenzjali ħżiena għas-saħħa ta' kimika partikolari għall-ittestjar (16) (17) (18) (19).

9. Il-metodi ta' statistika l-aktar adatti għall-analiżi ta' riżultati, meqjusin it-tifsila u l-għanijiet sperimentali, għandhom ikunu stabbiliti qabel ma jingħata bidu għall-istudju. Kwistjonijiet li għandhom jitqiesu jinkludu jekk l-istatistika għandhiex tinkludi aġġustament għal sopravivenza, analiżi ta' riskji kumulattivi ta' kanċer relattiv għal kemm iddum is-sopravivenza, analiżi taż-żmien għal tumur u analiżi fil-każ ta' tmiem ħesrem ta' grupp wieħed jew aktar. Gwida dwar l-analiżi xierqa ta' statistika u referenzi ewlenin għal metodi ta' statistika aċċettati internazzjonalment jingħataw fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), u wkoll fid-Dokument ta' Gwida Nru 35 dwar l-analiżi u l-evalwazzjoni ta'studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità (20).

10. Fit-tmexxija ta' studju tal-karċinoġeniċità, il-prinċipji u l-konsiderazzjonijiet ta' gwida li l-profil tagħhom jinsab fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-għarfien, il-valutazzjoni u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmiem b'mod uman għal annimali għall-esperimenti użati f'evalwazzjoni tas-sikurezza (21), b'mod partikolari l-paragrafu 62 tiegħu, għandhom ikunu segwiti dejjem. Dan il-paragrafuq jiddikjara li "*Fi studji li jinvolvu dożaġġ ripetut, meta annimal juri sinjali kliniċi li huma progressivi, u jwasslu għal iktar deterjorament fil-kundizzjoni, għandha tittieħed deċiżjoni infurmata dwar jekk l-annimal għandux jinqatel b'mod uman jew le. Id-deċiżjoni għandha tinkludi konsiderazzjoni tal-valur tal-informazzjoni li għandha tinkiseb mill-manutenzjoni kontinwata ta' dak l-annimal fl-istudju, relattiv għall-kundizzjoni ġenerali tiegħu. Jekk tittieħed deċiżjoni biex l-annimal jibqa fit-test, il-frekwenza tal-osservazzjonijiet għandha tiżdied, skont il-bżonn. Jista' jkun possibbli wkoll, mingħajr ma jaffettwa b'mod avvers l-iskop tat-test, li d-dożaġġ jieqaf temporanjament jekk dan ħa jtaffi l-uġigħ jew l-iskumdità, jew li tonqos id-doża tat-test.*"

11. Gwida dettaljata u diskussjoni dwar il-prinċipji ta' għażla ta' doża għal studji dwar tossiċità kronika u karċinoġeniċità tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), kif ukoll f'żewġ pubblikazzjonijiet tal-Internazzjonali Life Sciences Institute (22) (23). L-istrateġija bażika tal-għażla tad-doża tkun tiddependi mill-għan jew għanijiet primarji tal-istudju (il-paragrafu 6). Fl-għażla ta' livelli xierqa ta' doża, għandu jinkiseb bilanċ bejn tgħarbil ta' perikli min naħa waħda u karatterizzazzjoni ta' risponsi għal dożi baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naħa oħra. Dan huwa partikolarment rilevanti fil-każ ta' dan l-istudju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità.

12. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir dan l-istudju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità, milli eżekuzzjoni separata ta' studju dwar tossiċità kronika (il-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness) u studju tal-karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness). It-test konġunt jipprovdi aktar effiċjenza fir-rigward ta' ħin u spejjeż, u xi tnaqqis fl-użu ta' annimali, mqabbel ma' meta jsiru żewġ studji separati, mingħajr ħsara għall-kwalità tad-dejta jew fil-fażi kronika jew fil-fażi ta' karċinoġeniċità. Iżda għandhom jitqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 11 u 22-26) meta jsir studju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità, u huwa rikonoxxut ukoll li jistgħu jkunu meħtieġa studji separati f'ċerti oqfsa regolatorji. Gwida ulterjuri dwar it-tifsila tal-istudju konġunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità biex tinkiseb effiċjenza massima tal-istudju fir-rigward ta' possibbiltajiet għal tnaqqis f'għedud ta' annimali użati, kif ukoll permezz ta' sistema komuni għad-diversi proċeduri sperimentali tinsab fi Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

▼M4

13. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. Id-disinn tal-istudju jikkonsisti f'żewġ fażijiet parallelli, fażi kronika u fażi ta' karċinoġeniċità (għad-durata ara l-paragrafi 34 u 35 rispettivament). Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata bir-rotta orali għalkemm l-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni jew dermali jista' wkoll ikun adattat. Għal fażi kronika, il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'dożi gradwati lil diversi gruppi ta' annimali tat-test, b'livell ta' doża waħda għal kull grupp, normalment għal perjodu ta' 12-il xahar, għalkemm jistgħu jintgħażlu wkoll perjodi itwal jew aqsar skont rekwiżiti regolatorji (ara l-paragrafu 34). Dan il-perjodu jintgħażel li jkun twil biżżejjed biex kull effett ta' tossiċità kumulattiva jsir jidher, mingħajr l-effetti ta' taħwid ta' bidliet ġerjatriċi. It-tifsila tal-istudju tista' tinkludi wkoll qatla interim waħda jew aktar, eż. fit-tielet jew fis-sitt xahar, u jistgħu jkunu inklużi gruppi addizzjonali ta' annimali biex dan isir (ara l-paragrafu 20). Fil-fażi ta' karċinoġeniċità, il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum lil diversi gruppi ta' annimali tat-test għal porzjon kbir ta' ħajjithom kollha. L-annimali fiż-żewġ fażijiet ikunu osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità u għall-iżvilupp ta' leżjonijiet neoplastiċi. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimali

15. Dan il-Metodu ta' Ttestjar primarjament ikopri l-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità f'rodituri (il-paragrafu 2). L-użu ta' speċijiet ta' annimali mhux rodituri jista' jitqies meta dejta disponibbli tissuġġerixxi li jkunu aktar rilevanti għat-tbassir ta' effetti ta' saħħa fil-bnedmin. L-għażla ta' speċi għandha tkun iġġustifikata. L-ispeċi ppreferuta ta' rodituri huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' rodituri, eż. il-ġurdien. Għalkemm l-użu tal-ġurdien f'it-testjar tal-karċinoġeniċità jista' jkollu utilità limitata (24) (25) (26), skont xi programmi regolatorji preżenti l-ittestjar tal-karċinoġeniċità fil-ġurdien għadu meħtieġ sakemm ma jkunx deċiż li studju bħal dan ma jkunx meħtieġ xjentifikament. Firien u ġrieden kienu l-mudelli ppreferuti għall-esperimenti minħabba l-ħajja relattivament qasira tagħhom, l-użu kbir li jsir minnhom fi studji farmakoloġiċi u tossikoloġiċi, is-suxxettibbiltà tagħhom għal induzzjoni ta' tumur u li minnhom hemm razez karatterizzati biżżejjed. Bħala konsegwenza ta' dawn il-karatteristiċi, hemm ammont kbir ta' informazzjoni dwar il-fiżjoloġija u l-patoloġija tagħhom. It-tfassil u t-twettiq ta' studji dwar tossiċità kronika/karċinoġeniċità fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, meta jkunu meħtieġa, għandhom ikunu bbażati fuq il-prinċipji li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar flimkien ma' dawk fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali f'Annimali Mhux Rodituri ta' Doża Ripetuta għal 90 jum (6). Informazzjoni addizzjonali dwar għażla ta' speċi u razza hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

16. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju konġunt tat-tossiċità kronika/karċinoġeniċità għandu jsir f'annimali mill-istess razza u sors bħal dawk użati fi studju/i preliminari dwar tossiċità li jdum(u) anqas, għalkemm, jekk annimali minn din ir-razza u sors ikunu magħrufa li jippreżentaw problemi biex jinkisbu l-kriterji normalment aċċettati ta' sopravivenza għal studji fit-tul [ara d-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7)], għandu jitqies l-użu ta' razza ta' annimal li jkollha rata aċċettabli ta' sopravivenza għall-istudju fit-tul. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal.

▼M4

Kundizzjonijiet ta' abitazzjoni u għalf

17. L-annimali jistgħu jitqiedu jabitaw individwalment, jew jitqiegħdu f'gaġeġ fi gruppi żgħar tal-istess sess; abitazzjoni għal kull annimal waħdu għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (27) (28) (29). Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minħabba t-tqegħid ta' gaġeġ. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx 70 % minbarra matul il-ħasil tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. Id-dieta għandha tissodisfa l-ħtiġijiet nutrizzjonali kollha tal-ispeċi ttestjata u l-kontenut ta' kontaminanti tad-dieta, inklużi iżda mhux limitatament għal residwi ta' pestiċidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestroġeni, metalli tqal u mikotossini, li jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultat tat-test, għandu jkun baxx kemm jista' jkun. Informazzjoni analitika dwar il-livelli ta' kontaminanti tan-nutrijent u tad-dieta għandha tkun iġġenerata perjodikament, mill-anqas fil-bidu tal-istudju u meta jkun hemm bidla fil-lott użat, u għandha tkun inkluża fir-rapport finali. Bl-istess mod għandha tkun ipprovduta informazzjoni analitika dwar l-ilma tax-xorb użat fl-istudju. L-għażla ta' dieta tista' tkun influwenzata mill-ħtieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-ħtiġijiet nutrizzjonli tal-annimali meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tar-rotta tad-dieta.

Preparazzjoni tal-annimali

18. Għandhom jintużaw annimali f'saħħithom, li jkunu ġew akklimatizzati għal kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-anqas 7 ijiem li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. Fil-każ ta' rodituri, id-dożaġġ tal-annimali għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara ftim u akklimatazzjoni u preferibbilment qabel mal-annimali jkun għandhom 8 ġimgħat. L-annimali tat-test għandhom ikunu kkaratterizzati fir-rigward ta' speċi, razza, sors, sess, piż u età. Malli jinbeda l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż għal kull sess tal-annimali użati għandha tkun minimali u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju tal-annimali kollha fl-istudju, separatament għal kull sess. L-annimali għandhom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. Wara l-każwalità, m'għandux ikun hemm differenzi sinifikanti fil-piżijiet medji tal-ġisem bejn gruppi f'kull sess. Jekk ikun hemm differenzi sinifikanti ta' statistika, f'dak il-każ il-proċedura ta' każwalità għandha tkun ripetuta, jekk ikun possibbli. Kull annimal għandu jkun assenjat numru ta' identifikazzjoni uniku, u jkun immarkat b'mod permanenti b'dan in-numru b'tatù, b'impjant ta' mikroċipp jew b'metodu ieħor adattat.

PROĊEDURA

Għadd u sess tal-annimali

19. Għandhom jintużaw iż-żewġ sessi. Għandu jintuża għadd suffiċjenti ta' annimali biex evalwazzjoni bijoloġika u ta' statistika bir-reqqa tkun possibbli. Għal rodituri, kull grupp ta' doża (skont il-profil tiegħu fil-paragrafu 22) u grupp ta' kontroll konkurrenti maħsub fil-fażi ta' karċinoġeniċità tal-istudju għandhom, għalhekk, ikun fihom mill-anqas 50 annimal taż-żewġ sessi. Skont x'ikun l-għan tal-istudju, jista' jkun possibbli li tiżdied il-qawwa ta' statistika tal-istimi ewlenin billi annimali jkunu allokati b'mod differenzjali u mhux indaqs fil-gruppi varji ta' doża, b'aktar minn 50 annimal fil-gruppi ta' doża baxxa, eż. biex ikun stmat il-potenzjal karċinoġeniku f'dożi baxxi. Iżda għandu jkun irrikonoxxut li żieda moderata fid-daqs ta' grupp għandha tipprovdi relattivament ftit żieda fil-qawwa ta' statistika tal-istudju. Kull grupp ta' doża (skont

▼M4

il-profil tiegħu fil-paragrafu 22) u grupp ta' kontroll konkurrenti maħsub għall-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju għandu jkun fihom mill-anqas 10 annimali taż-żewġ sessi, fil-każ ta' rodituri. Għandu jkun innotat li dan l-għadd huwa aktar baxx minn dak fl-studju dwar tossiċità kronika (il-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness). L-interpretazzjoni tad-dejta mill-għadd imnaqqas ta' annimali għal kull grupp fil-fażi ta' tossiċità kronika ta' dan l-istudju konġunt ikun, iżda, sostnut mid-dejta mill-għadd akbar ta' annimali fil-fażi ta' karċinoġeniċità tal-istudju. Fi studji li jinvolvu ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali addizzjonali f'kull grupp ta' doża tal-fażi ta' tossiċità kronika, biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha. Aktar informazzjoni dwar tfassil ta' statistika tal-istudju u għażla ta' livelli ta' doża biex jintlaħaq il-massimu tal-qawwa ta' statistika hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

Provvediment għal qatliet interim, grupp satellitarju u annimali sentinelli

20. L-istudju jista' jipprovdi għal qatliet interim, eż. kull sitt xhur għall-fażi ta' tossiċità kronika, biex jagħti informazzjoni dwar progressjoni ta' bidliet mhux neoplastiċi u informazzjoni mekkanistika, jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Fejn diġà jkun hemm informazzjoni bħal din mill-istudji preċedenti ta' tossiċità ta' doża ripetuta dwar il-kimika għall-ittestjar, qatliet interim jistgħu ma jkunux xjentifikament ġustifikati. L-annimali użati fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju, li normalment iddum 12-il xahar (paragrafu 34), jipprovdu dejta dwar qatla interim fil-fażi ta' karċinoġeniċità tal-istudju, biex b'hekk jinkiseb tnaqqis fl-għadd ta' annimali użati globalment. Gruppi satellitarji jistgħu wkoll ikunu inklużi fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju, biex ikun hemm monitoraġġ tar-riversibbiltà ta' kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata. Dawn jistgħu jkunu ristretti għall-ogħla livell ta' doża tal-istudju flimkien ma' kontroll. Jista' wkoll ikun inkluż grupp addizzjonali ta' annimali sentinelli (tipikament 5 annimali għal kull sess) għall-monitoraġġ tal-istatus ta' mard, jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju (30). Gwida ulterjuri dwar tifsila tal-istudju biex tinkludi qatliet interim, annimali satellitarji u sentinelli, filwaqt li timminimizza l-għadd ta' annimali użati globalment, hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

21. Jekk annimali satellitarji u/jew qatliet interim ikunu inklużi fit-tifsila tal-istudju, l-għadd ta' annimali f'kull grupp ta' doża inklużi għal dan il-fini normalment ikun ta' 10 annimali għaż-żewġ sessi, u l-għadd totali ta' annimali inklużi fit-tifsila tal-istudju għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimalii li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Qatla interim u annimali satellitarji għandhom normalment isirulhom l-istess osservazzjonijiet, inkluż piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma, kejlijiet ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika u investigazzjonijiet patoloġiċi bħall-annimali fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju ewlieni, għalkemm jista' wkoll ikun hemm provvediment (fil-gruppi ta' qtil interim) biex kejlijiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità.

Gruppi ta' dożi u dożaġġ

22. Gwida dwar l-aspetti kollha ta' għażla ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Mill-anqas għandhom jintużaw tliet livelli ta' doża u kontroll konkurrenti, kemm għall-fażi kronika kif ukoll għall-fażi ta' karċinoġeniċità. Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

▼M4

23. Għall-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju, studju sħiħ bl-użu ta' tliet livelli ta' doża jista' ma jitqisx li jkun meħtieġ, jekk ikun jista' jiġi antiċipat li test f'livell ta' doża waħda, ekwivalenti għal mill-anqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum, aktarx ma jipproduċix effetti ħżiena. Dan għandu jkun abbażi ta' informazzjoni minn studji preliminari u konsiderazzjoni li tossiċità ma tkunx mistennija, abbażi ta' dejta minn kimiċi relatati strutturalment. Jista' jkun japplika limitu ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum ħlief meta espożizzjoni umana tindika l-ħtieġa li jkollu jintuża livell ogħla ta' doża.

24. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex ikunu identifikati l-organi prinċipali u l-effetti tossiċi filwaqt li jkunu evitati tbatija, tossiċità severa, morbidità jew mewt. Għandu normalment jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex jislet evidenza ta' tossiċità, kif ikun jidher, pereżempju, minn tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-ġisem (madwar 10 %). Iżda, skont x'ikunu l-għanijiet tal-istudju (ara l-paragrafu 6), tista' *tintgħażel l-ogħla doża anqas mid-doża* li tipprovdi evidenza ta' tossiċità, eż. jekk doża tislet effett ħażin ta' tħassib, li madankollu jkollha ftit impatt fuq il-ħajja jew il-piż tal-ġisem.

25. Jistgħu jintgħażlu livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża biex ikunu stabbiliti doża-rispons u, skont il-modalità ta' azzjoni tal-kimika għall-ittestjar, NOAEL jew riżultat maħsub ieħor tal-istudju, eż. BMD (ara l-paragrafu 27). Fatturi li għandhom jitqiesu fl-għoti ta' dożi aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-dożi li fihom jistgħu jseħħu bidliet importanti fil-metaboliżmu jew il-modalità ta' azzjoni tossika, fejn ikun mistenni limitu, jew fejn ikun mistenni punt ta' tluq għal estrapolazzjoni ta' doża baxxa. Fit-tmexxija ta' studju konġunt dwar karċinoġeniċità/tossiċità kronika, l-għan primarju għandu jkun li tinkiseb informazzjoni għal finijiet ta' valutazzjoni tar-riskju minn karċinoġeniċità, u informazzjoni dwar tossiċità kronika tkun normalment għan sussidjarju. Wieħed għandu jiftakar dan meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża għall-istudju.

26. L-ispazjar magħżul ta' livelli ta' doża jkun jiddependi mill-għanijiet tal-istudju u mill-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar, u ma jistax ikun preskritt fid-dettall f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, iżda intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss jipprovdu prestazzjoni tajba ta' test meta jintużaw biex ikunu stabbiliti l-livelli minn fuq għal isfel ta' dożi, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' test sikwit hija preferibbli mill-użu ta' intervalli twal ħafna (eż. aktar minn fattur ta' madwar 6-10) bejn dożaġġi. B'mod ġenerali l-użu ta' fatturi akbar minn 10 għandu jkun evitat, u għandu jkun iġġustifikat jekk ikun applikat.

27. Skont il-profil ulterjuri tagħhom li jinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), punti li għandhom jitqiesu fl-għażla ta' doża jinkludu:

— Nonlinearitajiet magħrufin jew suspettati jew punti ta' infezzjoni fid-doża-rispons;

— Tossikokinetika u firxa ta' dożi fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn dożi esterni u interni jseħħu jew ma jseħħux;

— Leżjonijiet prekursuri, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;

▼M4

— Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta’ modalità ta’ azzjoni, bħal dożi li fihom tibda tfaqqa’ ċ-ċitotossiċità, livelli ta’ ormoni jitħawdu, mekkaniżmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;

— Reġjuni tal-kurva ta’ doża-rispons fejn tkun meħtieġa stima partikolarment robusta, eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;

— Konsiderazzjonita’ livelli antiċipati ta’ espożizzjoni umana, speċjalmentfl-għażla ta’ dożi medji u baxxi.

28. Il-grupp ta’ kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta’ kontroll ta’ vejjikoli jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Ħlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta’ kontroll għandhom ikunu maniġġati b’mod identiku bħal dawk fil-gruppi tat-test. Jekk jintuża vejjikolu, il-grupp ta’ kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-ogħla volum użat fost il-gruppi ta’ doża. Jekk kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, u tikkawża li jittieħed anqas ikel tad-dieta b’mod sinifikanti minħabba dieta b’anqas palat, grupp ta’ kontroll addizzjonali ta’ tmigħ lil pari jista’ jkun utli biex iservi ta’ kontroll aktar adattat.

Preparazzjoni ta’ dożi u amministrazzjoni ta’ kimika għall-ittestjar

29. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata oralment, permezz tad-dieta jew ilma tax-xorb, jew b’gavage. Informazzjoni addizzjonali dwar rotot u metodi ta’ amministrazzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (7). Ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-għan tal-istudju, mill-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mid-disponibbiltà bijoloġika tagħha, u mir-rotta predominanti u mill-metodu ta’ espożizzjoni umana. Għandu jkun ipprovdut motiv għar-rotta magħżula u għall-metodu ta’ amministrazzjoni. Fl-interessi ta’ trattament xieraq tal-annimali, gavage orali għandu normalment jintgħażel biss għal dawk l-aġenti li għalihom din ir-rotta u l-metodu ta’ amministrazzjoni raġonevolment jirrappreżentaw espożizzjoni potenzjali umana (eż. farmaċewtiċi). Għal kimiċi ta’ dieta jew ambjentali inklużi pestiċidi, l-amministrazzjoni tipikament issir permezz tad-dieta jew b’ilma tax-xorb. Iżda, għal xi xenarji, eż. espożizzjoni okkupazzjonali, amministrazzjoni permezz ta’ rotot oħra tista’ tkun aktar adattata.

30. Meta jkun meħtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinħall jew tiġi sospiża f’vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u addittivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprjetajiet kimiċi tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u effetti fuq l-ikel jew fuq il-konsum tal-ilma jew fuq l-istat nutrizzjonali tal-annimali. Huwa rrakkomandat li, kull meta jkun possibbli, l-ewwel jitqies l-użu ta’ soluzzjoni fl-ilma/sospensjoni, segwit minn konsiderazzjoni ta’ soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħa) u mbagħad possibbilment b’soluzzjoni f’vejjikoli oħra. Għal vejjikoli oħra minbarra ilma, il-karatteristiċi tossiċi tal-vejjikolu għandhom ikunu magħrufa. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar l-istabbiltà tal-kimika għall-ittestjar u l-omoġeneità ta’ soluzzjonijiet ta’ dożaġġ jew dieti (kif jixraq) skont il-kundizzjonijiet ta’ amministrazzjoni (eż. dieta).

31. Għall-kimiċi amministrati permezz tad-dieta jew l-ilma tax-xorb, huwa importanti jkun żgurat li l-kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Fi studji fit-tul dwar tossiċità bl-użu ta’ amministrazzjoni ta’ dieta, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-għalf m’għandhiex tkun aktar ‘il fuq mil-limitu ta’ 5 % tad-dieta totali, biex ikunu evitati żbilanċi nutrizzjonali. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, jistgħu jintużaw jew konċentrazzjoni kostanti ta’ dieta (mg/kg dieta jew ppm), jew livell wieħed kostanti ta’ doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgħa. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼M4

32. Fil-każ ta’ amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-ġimgħa) għal perjodu ta’ 12-il xahar (fażi kronika) jew 24 xahar (fażi ta’ karċinoġeniċità), ara wkoll il-paragrafi 33 u 34. Kwalunkwe reġim ieħor ta’ dożaġġ, eż. ħamest ijiem fil-ġimgħa, jeħtieġlu jkun iġġustifikat.. Fil-każ ta’ amministrazzjoni dermali, annimali jkunu normalment ittrattati bil-kimika għall-ittestjar għal mill-anqas 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, kif speċifikat fil-Kapitolu B.9 ta’ dan l-Anness (11), għal perjodu ta’ 12-il xahar (fażi kronika) jew 24 xahar (fażi ta’ karċinoġeniċità). Espożizzjoni bir-rotta tal-inalazzjoni ssir għal 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, iżda tista’ tintuża wkoll espożizzjoni għal 5 ijiem fil-ġimgħa, jekk dan ikun ġustifikat. Il-perjodu ta’ espożizzjoni jkun normalment għal perjodu ta’ 12-il xahar (fażi kronika) jew 24 xahar (fażi ta’ karċinoġeniċità). Jekk speċijiet ta’ rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, il-perjodi massimi ta’ espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas id-diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Għandu jkun ipprovdut motiv meta tintuża espożizzjoni li ddum anqas minn 6 sigħat kuljum. Ara wkoll il-Kapitolu B.8 ta’ dan l-Anness (9).

33. Meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b’gavage lill-annimali dan għandu jsir billi jintuża tubu tal-istonku jew tubu rqiq ta’ intubazzjoni adattat, f’ħinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża waħda darba kuljum, meta pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista’ jkun possibbli li tinżamm ir-rata ta’ doża kuljum billi din tkun amministrata bħala doża maqsuma (darbtejn kuljum). Il-volum massimu ta’ likwidu li jkun jista’ jiġi amministrat f’waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum għandu jinżamm baxx daqs kemm ikun prattikabbli, u normalment m’għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem għal rodituri (31). Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistgħu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jeħtiġilhom jiġu dilwiti biex ikunu evitati effetti lokali severi. Ittestjar f’konċentrazzjonijiet li x’aktarx ikunu korrużivi jew irritanti għas-sistema gastrointestinali għandu jkun evitat.

Durata tal-istudju

34. Il-perjodu ta’ dożaġġ u durata tal-fażi kronika ta’ dan l-istudju jkunu normalment ta’ 12-il xahar, għalkemm it-tifsila tal-istudju tippermetti wkoll u tista’ tkun applikata għal studji li jdumu anqas (eż. 6 jew 9 xhur) jew aktar (eż. 18 jew 24 xhur), skont ir-rekwiżiti ta’ reġimi regolatorji partikolari jew għal għanijiet mekkanistiċi speċifiċi. Devjazzjonijiet minn espożizzjoni li ddum 12-il xahar għandhom ikunu ġġustifikati, l-aktar fil-każ ta’ dawk li jdumu anqas. Il-gruppi kollha ta’ doża allokati lil din il-fażi għandhom jintemmu fiż-żmien indikat għal evalwazzjoni ta’ tossiċità kronika u għal patoloġija mhux neoplastika. Gruppi satellitarji inklużi għall-monitoraġġ tar-riversibbiltà ta’ kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata għandhom jinżammu mingħajr dożaġġ għal perjodu ta’ mhux anqas minn 4 ġimgħat u ta’ mhux aktar minn terz ta’ kemm idum l-istudju totali wara li tkun intemmet espożizzjoni.

35. Id-durata tal-fażi ta’ karċinoġeniċità ta’ dan l-istudju tkun normalment ta’ 24 xahar għal rodituri, li jirrappreżenta l-maġġoranza tal-ħajja kollha normali tal-annimali li għandhom jintużaw. Jistgħu jintużaw studji aqsar jew itwal, skont it-tul tal-ħajja tar-razza tal-ispeċijiet ta’ annimali fl-istudju, iżda għandhom ikunu ġġustifikati. Għal razez speċifiċi ta’ ġrieden, eż. AKR/J, C3H/J jew C57BL/6J durata ta’ 18-il xahar tista’ tkun aktar adattata. Dan li ġej jipprovdi xi gwida dwar durata, tmiem tal-istudju u sopravivenza; gwida ulterjuri, inkluża konsiderazzjoni tal-aċċettabbiltà ta’ studju ta’ karċinoġeniċità negattiva relattiva għal sopravivenza fl-istudju, hija pprovduta fid-Dokument ta’ Gwida Nru 116 (7):

▼M4

— It-tmiem tal-istudju għandu jitqies meta l-għadd ta' superstiti fil-gruppi ta' doża aktar baxxa jew fil-grupp ta' kontroll jinżel taħt il-25 fil-mija.

— Fil-każ fejn il-grupp ta' doża għolja biss imut ħesrem minħabba tossiċità, dan m'għandux jikkawża t-tmiem tal-istudju.

— Is-sopravivenza ta' kull sess għandha titqies separatament.

— L-istudju m'għandux ikun estiż lil hinn mill-punt meta d-dejta disponibbli mill-istudju ma tkunx aktar suffiċjenti biex tkun tista' ssir evalwazzjoni valida statistikament.

OSSERVAZZJONIJIET (FAŻI TA' TOSSIĊITÀ KRONIKA)

36. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbidità jew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u t-tmiem ta' kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. Osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-anqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess ħin(ijiet) kull jum, filwaqt li jitqies il-perjodu massimu ta' effetti antiċipati wara dożaġġ fil-każ ta' amministrazzjoni b'gavage.

37. Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru fuq l-annimali kollha mill-anqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (biex jitħallew isiru paraguni skont is-suġġett), fi tmiem l-ewwel ġimgħa tal-istudju u kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-protokoll għal osservazzjonijiet għandu jkun magħmul b'mod li varjazzjonijiet bejn osservaturi individwali jkunu mminimizzati u indipendenti minn grupp ta' test. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra mill-gaġġa ta' abitazzjoni, preferibbilment f'arena standard u f'ħinijiet simili għal kull jum f'kull okkażjoni. Huma għandhom ikunu rreġistrati sewwa, preferibbilment billi jintużaw sistemi ta' punti, iddefiniti espliċitament mil-laboratorju tal-ittestjar. Għandhom isiru sforzi biex ikun żgurat li varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' osservazzjoni jkunu minimi. Sinjali nnotati għandhom jinkludi, iżda ma jkunux limitati għal, bidliet fil-ġilda, pil, għajnejn, membrani mukużi, okkorrenza ta' sekrezzjonijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż. tidmigħ, erezzjoni tal-pil, daqs tal-pupilli, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Bidliet fil-mixja, qagħda u rispons għal immaniġġar, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, stereotipi (eż. tindif eċċessiv, dawran ripetittiv) jew imġiba biżarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (32).

38. Eżami oftalmoloġiku, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir ieħor adattat, għandu jsir fuq l-annimali kollha qabel l-ewwel amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Fit-tmiem tal-istudju, dan l-eżami għandu preferibbilment isir għall-annimali kollha iżda mill-anqas fid-doża għolja u fil-gruppi ta' kontroll. Jekk fl-għajnejn jinstabu bidliet relatati ma' trattament, l-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati. Jekk analiżi strutturali jew informazzjoni oħra jissuġġerixxu tossiċità okulari, f'dak il-każ il-frekwenza ta' eżami okulari għandha tiżdied.

39. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta' tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti newrotossiċi, reattività sensorja għal stimuli ta' tipi differenti (32) (eż. stimuli tas-smigħ, viżivi u proprjoċettivi) (33) (34) (35), ikunu jistgħu jsiru b'mod fakultattiv valutazzjoni tal-qawwa ta' qbid (36) u valutazzjoni tal-attività motorja (37) qabel il-bidu tal-istudju u f'perjodi ta' 3 xhur wara li jkun beda l-istudju sa u inklużi 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar). Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi.

▼M4

40. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta' tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti immunotossiċi, investigazzjonijiet ulterjuri ta' dan il-punt ta' tmiem ikunu jistgħu jsiru b'mod fakultattiv fit-tmiem.

Piż tal-ġisem, konsum ta' ikel/ilma u effiċjenza fl-ikel

41. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejlijiet ta' konsum ta' ikel u ta' effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata f'ilma tax-xorb. Għandhom jitqies wkoll kejlijiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

Ematoloġija u bijokimika klinika

42. Fi studji li jinvolvu rodituri, għandhom isiru eżamijiet ematoloġiċi fuq l-annimali kollha tal-istudju (10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp) kull 3, 6, u 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar). Għal ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha (ara l-paragrafu 19). Fi studji ta' annimali mhux rodituri, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'ħinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal rodituri. Il-kejlijiet kull 3 xhur, għal rodituri jew għal annimali mhux rodituri, jistgħu ma jsirux jekk ma jkunu dehru ebda effetti fuq parametri ematoloġiċi fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Għandhom jittieħdu kampjuni tad-demm minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardijaku jew minn sinus retroorbitali, b'anestesija.

43. Il-lista ta' parametri li ġejja għandha tkun investigata (38): Għadd total u differenzjali ta' lewkoċiti, għadd ta' eritroċiti, għadd ta' pjastrini, konċentrazzjoni ta' emoglobina, ematokrit (volum ta' ċelluli ppakkjati), volum korpuskulari medju (MCV), emoglobina korpuskulari medja (MCH), konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja (MCHC), ħin protrombin u ħin tromboplastin parzjali attivat. Parametri ematoloġiċi oħra bħal korpi ta' Heinz jew morfoloġija atipika oħra ta' eritroċiti jew metemoglobina jistgħu jitkejlu kif jixraq skont it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, għandu jkun adottat approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar. Jekk il-kimika għall-ittestjar ikollha effett fuq is-sistema ematopojetika, jistgħu jkunu indikati wkoll għedud ta' retikoloċiti u ċitoloġija tal-mudullun tal-għadam, għalkemm dawn għandhom isiru b'rutina.

44. Determinazzjonijiet ta' bijokimika għall-investigazzjoni ta' effetti tossiċi maġġuri f'tessuti u, speċifikatament, ta' effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demm miksubin mill-annimali kollha tal-istudju (10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp), fl-istess intervalli ta' ħin kif speċifikat għall-investigazzjonijiet ematoloġiċi. Għal ġrieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika kollha meħtieġa. Fi studji ta' annimali mhux rodituri, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'ħinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal rodituri. Jistgħu ma jsirux kejlijiet kull 3 xhur għal rodituri jew għal annimali mhux rodituri jekk ma jkun deher ebda effett fuq parametri ta' bijokimika klinika fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Huwa rrakkomandat sawm

▼M4

tul il-lejl għall-annimali (bl-eċċezzjoni tal-ġrieden) qabel ma jittieħdu kampjuni tad-demm ([1]). Il-lista ta' parametri li ġejja għandha tkun investigata (38): glukożju, urea (nitroġenu tal-urea), kreatinina, proteina totali, albumina, kalċju, sodju, potassju, kolesterol totali, mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatoċellulari (aminotransferaži tal-alanina, aspartate aminotransferaži, glutamat ta' deidroġenaži, aċidi totali tal-bili) (39), u mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatobiljari (fosfataži alkalina, gamma glutamil trasferimentaži, 5'-nukleotidaži, bilirubina totali, aċidi totali tal-bili) (39). Parametri oħra ta' bijokimika klinika bħal trigliċeridi sajmin, ormoni speċifiċi u kolinesteraži jistgħu jitkejlu kif jixraq, skont it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, hemm ħtieġa ta' approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar.

45. Determinazzjonijiet ta' analiżi tal-awrina għandhom isiru fuq l-annimali kollha tal-istudju (10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp), fuq kampjuni miġburin fl-istess intervalli bħal dawk għall-ematoloġija u l-kimika klinika. Ma jkunx meħtieġ isiru kejlijiet kull 3 xhur jekk ma jkun deher ebda effett fuq analiżi tal-awrina fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Il-lista ta' parametri li ġejja kienet inkluża f'rakkomandazzjoni esperta dwar studji ta' patoloġija klinika (38): dehra, volum, ożmolalità jew gravità speċifika, pH, proteina totali u glukożju. Determinazzjonijiet oħra jinkludu keton, urobilinoġenu, bilirubina u demm moħbi. Jistgħu jintużaw aktar parametri meta jkun meħtieġ biex tkun estiża l-investigazzjoni ta' effett(i) osservat(i).

46. Huwa meqjus b'mod ġenerali li jeħtieġu jkunu ddeterminati varjabbli bażi ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel trattament għal studji dwar il-klieb, iżda ma jeħtiġilhomx ikunu ddeterminati fi studji dwar rodituri (38). Iżda, jekk dejta bażi storika (ara l-paragrafu 58) ma tkunx adegwata, għandu jitqies li tkun iġġenerata dejta bħal din.

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

47. L-annimali kollha fl-istudju għandhom normalment ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. Iżda jista' wkoll ikun hemm provvediment (fil-qatla interim jew fi gruppi satellitarji) biex kejlijiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità (ara l-paragrafu 21). Dawn l-annimali jistgħu ma jkunux soġġetti għal awtopsja u għall-proċeduri sussegwenti deskritti fil-paragrafi li ġejjin. L-annimali sentinelli jista' jkun jeħtiġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju.

([1]) Għal għadd ta' kejlijiet ta' serum u plażma, notevolment l-aktar għall-glukożju, sawm matul il-lejl huwa ppreferut. Ir-raġuni ewlenija għal din il-preferenza hija li aktar varjabbiltà li għandha inevitabbilment tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, tittendi li taħbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċili. Iżda għandu jkun innotat li sawn tul il-lejl jista' joħloq interferenza fil-metaboliżmu ġenerali tal-annimali u, b'mod partikolari fi studji dwar għoti ta' ikel, jista' jiddisturba l-espożizzjoni ta' kull jum għall-kimika għall-ittestjar. L-annimali kollha għandhom ikunu vvalutati fl-istess kondizzjoni fiżjoloġika, u valutazzjonijiet dettaljati jew newroloġiċi għandhom preferibbilment ikunu, għalhekk, skedati għal jum differenti milli għal teħid ta' kampjuni ta' bijokimika klinika.

▼**M4**

48. Pożijiet ta' organi għandhom jingabru mill-annimali kollha, minbarra dawk eskluži bil-parti tal-aħħar tal-paragrafu 47. L-adrenali, il-moħħ, l-epididimi, il-qalb, il-kliewi, il-fwied, l-ovarji, il-milsa, it-testikoli, it-tirojde (jintiżnu wara fissazzjoni, ma' paratirojdi), u l-utru tal-annimali kollha (minbarra ta' dawk misjubin qed imutu u/jew qed jinqatlu fil-frattemp) għandhom jintraqmu minn kull tessut imwaħħal magħhom, kif jixraq, u l-piż tagħhom fl-imxarrab għandu jittieħed malajr kemm jista' jkun wara dissezzjoni biex ma jitħalliex ikun hemm inxif.

49. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (40) (tessuti f'parenteżi kwadri huma fakultattivi):

il-leżjonijiet kbar kollha	qalb	frixa	stonku (il-parti quddimija tal-istonku, stonku glandolari)
glandola adrenali	ileu	glandola tal-paratirojde	[snien]
aorta	jejunum	nerv periferali	testikoli
moħħ (inkluži taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/meżoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugħ (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]
glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-ħoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inkluži mnieħer, turbinati u sinus paranażali]	ġilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtoraċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vaġina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-għadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-għadam
Glandola ta' Harder			

▼M4

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermali ta' amministrazzjoni, il-lista ta'organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata, u jkunu meħtieġa teħid ta' kampjuni speċifiċi u preservazzjoni tal-ġilda mis-sit ta' applikazzjoni. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9) u tal-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (10). Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

Istopatoloġija

50. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (40). L-eżamijiet istopatoloġiċi minimi għandhom ikunu:

— it-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;

— it-tessuti kollha minn annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;

— it-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi;

— it-tessuti mmirati jew tessuti li wrew bidliet relatati ma' trattament fil-grupp ta' doża għolja, mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;

— fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu eżaminati.

OSSERVAZZJONIJIET (FAŻI TA' KARĊINOĠENIĊITÀ)

51. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbiditá jew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u fit-tmiem ta' kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. L-annimali għandhom addizzjonalment ikunu eżaminati darba kuljum għal sinjali speċifiċi ta' rilevanza tossikoloġika. Fil-każ ta' studji dwar gavage, annimali għandhom ikunu eżaminati fil-perjodu li jiġi minnufih wara dożaġġ. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lil żvilupp ta' tumuri; u għandu jiġi rreġistrat iż-żmien meta jfaqqgħu tumuri, post, dimensjonijiet, dehra u progressjoni ta' kull tumur li jkun jidher sewwa u jista' jintmess.

52. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejlijiet ta' konsum ta' ikel u ta' effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata f'ilma tax-xorb. Għandhom jitqies wkoll kejlijiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

▼M4

Ematoloġija, bijokimika klinika u kejlijiet oħra

53. Biex jintlaħaq il-massimu tal-informazzjoni miksuba mill-istudju, speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni, ikunu jistgħu jittieħdu kampjuni tad-demm għal ematoloġija u bijokimika klinika, għalkemm dan ikun fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. L-analiżi tal-awrina tista' wkoll ikun adattata. Dejta dwar l-annimali użati fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju, li normalment iddum 12-il xahar (il-paragrafu 34) għandha tipprovdi informazzjoni dwar dawn il-parametri. Gwida ulterjuri dwar il-valur ta' teħid ta' kampjuni bħal dawn bħala parti minn studju tal-karċinoġeniċità hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Jekk jittieħdu kampjuni tad-demm, dawn għandhom jinġabru fit-tmiem tal-perjodu tat-test, eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-qtil tal-annimali. Huma għandhom jittieħed minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardijaku jew mis-sinus retroorbitali, b'anestesija. Jistgħu wkoll ikunu ppreparati tiċpisiet għal eżami, partikolarment jekk ikun jidher li l-mudullun tal-għadam ikun l-organu mmirat, għalkemm il-valur ta' eżami bħal dan ta' tiċpisiet tad-demm fil-fażi ta' karċinoġeniċità għall-valutazzjoni ta' potenzjal karċinoġeniku/onkoġeniku huwa dubjuż (38).

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

54. L-annimali kollha fl-istudju ħlief annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra (ara l-paragrafu 20) għandhom ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika sħiħa u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fetħiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. L-annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra jista' jkun jeħtiġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Piżijiet ta' organi ma jkunux normalment parti minn studju karċinoġenesi, minħabba li bidliet ġerjatriċi u, fi stadji ta' wara, l-iżvilupp ta' tumuri tħawwad l-utilità ta' dejta dwar piżijiet ta' organi. Huma jistgħu, iżda, ikunu importanti biex jittieħed piż ta' valutazzjoni ta' evidenza u speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni. Jekk ma jkunux parti minn studju satellitarju, huma għandhom jinġabru mhux aktar tard minn sena wara l-bidu tal-istudju.

55. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku maħsub sussegwentement (40) (tessuti f'parenteżi kwadri huma fakultattivi):

il-leżjonijiet kbar kollha	qalb	frixa	stonku (il-parti quddimija tal-istonku, stonku glandolari)
glandola adrenali	ileu	glandola tal-paratirojde	[snien]
aorta	jejunum	nerv periferali	testikoli
moħħ (inkluż taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/meżoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugħ (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]
glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-ħoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina

▼M4

duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inklużi mnieħer, turbinati u sinus paranażali]	ġilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtoraċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vaġina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-għadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-għadam
Glandola ta' Harder			

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-ħtieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprjetajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermali ta' amministrazzjoni, il-lista ta'organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata, u jkunu meħtieġa teħid ta' kampjuni speċifiċi u preservazzjoni tal-ġilda mis-sit ta' applikazzjoni. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (8) u tal-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (9). Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

Istopatoloġija

56. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (40). Il-minimu ta' tessuti eżaminati għandu jkun:

— It-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;

— It-tessuti kollha ta' annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;

— It-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi inklużi tumuri;

— Meta bidliet istopatoloġiċi relatati ma' trattament ikunu osservati fil-grupp ta' doża għolja, dawk l-istess tessuti għandhom ikunu eżaminati mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;

— Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR (KARĊINOĠENIĊITÀ U TOSSIĊITÀ KRONIKA)

Dejta

57. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. Addizzjonalment, id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali fil-bidu tat-test, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani u l-ħin ta' kull mewta jew qatla b'mod uman, l-għadd ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż iż-żmien meta jibdew ifaqqgħu, durata u severità ta' kull effett tossiku, l-għadd ta' annimali li juru leżjonijiet, it-tip ta' leżjonijiet u l-perċentwali tal-annimali li juru kull tip ta' leżjoni. Tabelli ta' sommarji ta' dejta għandhom jipprovdu l-mezzi u d-devjazzjonijiet standard (għal dejta ta' test kontinwu) ta' annimali li juru effetti tossiċi jew leżjonijiet, minbarra l-gradazzjoni tal-leżjonijiet.

58. Dejta storika ta' kontroll tista' tkun siewja fl-interpretazzjoni tar-riżultati tal-istudju, eż., fil-każ meta jkun hemm indikazzjonijiet li d-dejta pprovduta mill-kontrolli konkurrenti tkun sostanzjalment diversa meta mqabbla ma' dejta reċenti minn annimali ta' kontroll mill-istess faċilità/kolonja tat-test. Dejta storika ta' kontroll, jekk tkun evalwata, għandha tkun sottomessa mill-istess laboratorju, tkun tirrelata ma' annimali tal-istess età u razza u ġġenerata matul il-ħames snin li jkunu ġew qabel l-istudju inkwistjoni.

59. Meta jkunu applikabbli, ir-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-metodi ta' statistika u d-dejta li jkollha tiġi analizzata għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju (il-paragrafu 9). L-għażla għandha tipprovdi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun meħtieġ.

60. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

— natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;

— dejta ta' identifikazzjoni;

— sors tal-kimika;

— numru tal-lott;

— ċertifikat tal-analiżi tal-kimika.

Vejjikolu (fejn xieraq):

— ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma).

Annimali tat-test:

— speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;

— għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;

— sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;

— piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

▼M4

Kundizzjonijiet tat-test:

— motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;

— meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;

— dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta;

— dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;

— rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieħer jew il-ġisem kollu;

— doži attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), u fattur ta' konverżjoni minn konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (mg/kg jew ppm) ta' dieta/ilma tax-xorb għad-doża attwali, jekk applikabbli;

— dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Riżultati (għandhom ikunu ppreżentati sommarji tad-dejta tabulata u dejta dwar annimali individwali):

Ġenerali

— Dejta dwar sopravivenza;

— Piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;

— Konsum ta' ikel, kalkulazzjonijiet ta' effiċjenza fl-ikel, jekk ikunu saru, u konsum tal-ilma jekk applikabbli;

— Dejta tossikokinetika jekk disponibbli;

— Oftalmoskopija (jekk disponibbli)

— Ematoloġija (jekk disponibbli)

— Kimika klinika (jekk disponibbli)

Sejbiet kliniċi

— Sinjali ta' tossiċità;

— Inċidenza (u, jekk bil-punti, severità) ta' kull anormalità;

— Natura, severità, u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk hux tranżitorji jew permanenti);

Dejta dwar l-awtopsja

— Piż terminali tal-ġisem;

— Piżijiet ta' organi u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli;

— Sejbiet minn awtopsji; inċidenza u severità ta' anormalitajiet.

Istopatoloġija

— Sejbiet istopatoloġiċi mhux neoplastiċi,

— Sejbiet istopatoloġiċi neoplastiċi,

▼M4

— Korrelazzjoni bejn sejbiet makroskopiċi u mikroskopiċi;

— Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi kollha relatati ma' trattament inklużi gradazzjonijiet ta' severità;

— Rapport ta' kull evalwazzjoni bejn il-pari tas-slides

Trattament ta' statistika ta' riżultati, kif jixraq

Diskussjoni dwar riżultati inklużi:

— Diskussjoni dwar kull approċċ ta' mudellar

— Relazzjonijiet ta' doża-rispons

— Dejta storika ta' kontroll

— Konsiderazzjoni ta' kwalunkwe informazzjoni dwar il-modalità tal-azzjoni

— Determinazzjoni ta' BMD, NOAEL jew LOAEL

— Rilevanza għall-bnedmin

Konklużjonijiet

LETTERATURA:

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) Il-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossiċità Orali dwar Doża Ripetuta għal 90 Jum ta' Test ta' Subtossiċità Kronika Orali f'Annimali Mhux Rodituri.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness. Tossiċità tal-Inalazzjoni Subakuta: Studju ta' 28 jum.

(10) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subkronika: Studju ta' 90 Jum.

(11) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossiċità (Dermali) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).

▼M4

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN u Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼**M4**

(27) Id-Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼B

B.34. **TEST TA' TOSSIĊITÀ FUQ IR-RIPRODUZZJONI FUQ 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 somministrata f'doži 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 kwalunkwe effetti negattiv tas-sustanza ittestjata fuq l-ispermatoġenesi.

Nisa tal-ġenerazzjoni parentali (P) għandhom ikunu iddożati għal-linqas għal żewġ ċikli totali ta' saħna sesswali sabiex joħroġ kwalunkwe effett negattiv tas-sustanza ittestjata fuq din is-saħna sesswali. Imbagħad l-annimali jiġu mgħammra. Is-sustanza ittestjata tiġi somministrata 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 ġol-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 kundizzjonijiet ta' akkomodazzjoni u ikel għallinqas għal ħamest ijiem qabel it-test. Huwa rakkomandat li s-sustanza ittestjata tkun somministrata 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.

▼B

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.

Kundizzjonijiet 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 somministrata s-sustanza 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 mortalitá 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 somministrata 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 bżonnjuži. Jekk studju preliminari f'livell ta' doża qawwija, b'evidenza definite ta' tossiċità maternali, ma jurix effetti negattivi fuq il-fertilitá, studji tad-doża f'livelli oħra jistgħu ma jiġux ikkunsidrati bżonnjuži.

▼B

Eżekuzzjoni tat-test

Skedi sperimentali

L-għoti tad-doża ta' kuljum lill-irġiel parentali (P) għandu jibda meta jkollhom etá 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 għal-linqas 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' fertilitá 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-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 milli 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.

▼B

Osservazzjonijiet

Matul dan il-perjodu tat-test, kull animal għandu jkun osservat għal-linqas 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 kuljum. Wara t-twelid u waqt it-treddigħ, il-kejl tal-konsum ta' l-ikel (u ta' l-ilma meta s-sustanza ittestjata hi somministrata 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 kwalunkwe 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 suġġetti għal eżaminazzjoni mikroskopika.

▼B

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.

Fejn hu possibbli, ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' statistika xieraq. kwalunkwe metodu ta' statistika aċċettat jista' jintuża

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- vijabilità;

— 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.

▼B

B.35. STUDJU TAT-TOSSIĊITÀ REPRODUTTIVA FUQ ŻEWĠ ĠENERAZZJONIJIET

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika għal OECD TG 416 (2001)

1.1 INTRODUZZJONI

Dan il-metodu għal testijiet riproduttivi fuq żewġ ġenerazzjonijiet huwa iddisinjat li jipprovdi informazzjomni ġenerali li tikkonċerna l-effetti tas-sustanza tat-test fuq l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi ta' l-irġiel u n-nisa, inkluża l-funzjoni gonadali, iċ-ċiklu ta' l-estru, l-imġieba tat-tgħammir, il-konċepiment, il-ġestazzjoni, il-parturazzjoni, il-lattazzjoni, u l-ftim, u it-rtkabbir u l-iżvilupp tal-wild. L-istudju jista' wkoll jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tas-sustanza tat-test fuq il-morbidità ta' frieħ għadhom jitwieldu, il-mortalità, u d-dettalji preliminarji fuq l-iżvilupp tossiku ta' qabel it-twelid u ta' wara t-twelid u jservi bħala gwida għal testijiet sussegwenti. B'żieda ma l-istudju tat-tkabbir u l-iżvilupp tal-ġenerazzjoni F1, dan il-metodu tat-test huwa wkoll intiż li jassessja l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi maskili u femminili kif ukoll it-tkabbir u l-iżvilupp tal-ġenerazzjoni F2. Għal aktar informazzjoni dwar l-iżvilupp tossiku u d-defiċjenzi funzjonali, jew partijiet addizzjonali ta' l-istudju jistgħu inkorporati f'dan il-protokoll, b'konsulta mal-metodi tat-tossiċità ta' l-iżvilupp u/jew in-newrotassiċità ta' l-iżvilupp kif xieraq, jew inkella dawk il-miri finali jistgħu ikunu studjati fi studji separati, bl-użu ta' metodi xierqa tat-test.

1.2 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doži gradwali lil diversi gruppi maskili u femminili. L-irġiel tal-ġenerazzjoni P għandhom ikollhom id-doża waqt li jkunu jikbru u għal mill-anqas ċiklu speratoġenetiku sħiħ wieħed (madwar 56 jum fil-ġrieden u 70 jum fil-firien) sabiex ikunu misjuba l-effetti ħżiena fuq l-ispermatoġeneżi. L-effetti fuq l-isperma huma determinati bin-numru ta' parametri ta' l-isperma (eż. mortfoloġija u l-motilità ta' l-isperma) u l-preparazzjoni tan-nisġiet u ħistopatoloġija dettaljata. Jekk dettalji dwar l-ispermatoġeneżi jkunu disponibbli minn studju preċedenti dwar doża repetuta ta' tul ta' żmien suffiċjenti, eż. studju ta' 90 jum, l-irġiel tal-ġenerazzjoni P m'humiex meħtieġa li jkunu nklużi fl-evalwazzjoni. Huwa rakkommandabbli, b'dana kollu, li l-kampjuni jew ir-reġistrazzjoni diġitali ta' l-isperma tal-ġeberazzjoni P jkunu maħżuna, sabiex jiffaċilitaw evalwazzjoni fil-quddiem. Femminili tal-ġenerazzjoni P għandhom ikollhom id-doża matul it-tkabbir u għal diversi ċikli sħaħ ta' l-estru sabiex ikunu żvelati xi effetti ħżiena fuq in-normalità taċ-ċiklu ta' l-estru mis-sustanza tat-test. Is-sustanza tat-test hija somministrata lill-annimali parenti (P) matul it-tgħammir, matul it-tqala riżultanti, u matul il-ftim tal-wild tagħhom F1. Fil-ftim, l-amministrazzjoni tas-sustanza jitkompla lejn il-wild F1 matul it-tkabbir tagħhom lejn il-maturità, it-tgħammir u l-produzzjoni tal-ġenerazzjoni F2, sakemm il-ġenerazzjoni F2 tkun imfattma.

Osservazzjonijiet kliniċi u l-eżaminazzjonijiet patoloġiċi huma mwettqa fuq l-annimali kollha għal sinjali tat-tossiċità b'emfasi speċjali dwar l-effetti fuq l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi maskili u femminili u dwar it-tkabbir u l-iżvilupp tal-wild tagħhom.

▼B

1.3 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.3.1 **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

Il-far huwa l-ispeċje preferut għat-testijiet. Jekk ikunu użati speċje oħrajn, ġustifikazzjoni għandha tkun mogħtija u l-modifika xierqa ikunu meħtieġa. Tipi b'fekundità baxxa jew li huma sew magħrufa li għandhom inċidenza għolja ta' difetti fl-iżvilupp m'għandhomx ikunu użati. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati għandha tkun minima u ma teċċedix 20 % tal-piż medju ta' kull sess.

1.3.2 **Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata bil-ħtieġa li tkun assigurata inter-taħlita xierqa tas-sustanza tat-test meta somministrata b'dan il-metodu.

L-annimali jistgħu jinżammu individwalment jew li jkunu f'gaġġa bħala grupp żgħir ta' l-istess sess. Il-proċeduri ta' l-akkompanjament għandhom jitwettqu f'gaġġeġ adatti għal dak l-iskop. Wara l-evidenza tal-kopulazzjoni, in-nisa mgħammra għandhom jinzammu waħda kull gaġġa fil-gaġġeġ tal-maternità sa kemm iwelldu. Firien mgħammra jistgħu wkoll jinżammu fi gruppiu żgħat u imbagħad ikunu separati minn jum sa tnejn qabel il-parturazzjoni. L-annimali mgħammra għandhom ikunu ipprovduti bil-materjali xierqa u definiti sabiex ikunu jistgħu jippreparaw il-bejta, meta l-parturazzjoni tkun fil-qrib.

1.3.3 **Preparazzjoni ta' l-annimali**

Annimali b'saħħithom, li jkunu ġew akklamatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mil anqas 5 ijiem u li ma jkunux ġew suġġetti għal proċeduri preċedenti sperimentali, għandhom ikunu użati. L-annimali tat-test għandhom ikunu karatterizzati bħala speċje, razza, sorsi, seww, piż u/jew l-età. Kwalunkwe relazzjonijiet bejn l-aħwa fost l-annimali għandha tkun magħrufa sabiex it-tgħammir bejn l-aħwa jkun evitat. L-annimali għandhom ikunu assenjati kif jinzerta lejn il-grupp tal-kuntroll u tat-trattament (stratifikazzjoni bil-piż tal-ġisem hija rakkommandabbli). Il-gaġġeġ għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid fil-gaġġeġ ikunu minimizzat. Kull annimal għandu jkun assenjat numru uniku ta' l-identifikazzjoni. Għall-ġenerazzjoni P, dan għandu jsir qabel ma tibda d-doża. Għall-ġenertazzjoni F1, dan għandu jsir mat-ftim ta' dawk l-annimali li jkunu magħżula għat-tgħammir. Reġistri li jindikaw l-origini tal-botom għandhom jinżammu għall-annimali F1 kollha magħżula. B'żieda, identifikazzjoni individwali tal-frieħ malajr kemm jista' jkun possibbli malli jitwieldu hija rakkommandabbli, meta l-użin tal-frieħ individwali jew tat-testijiet funzjonali jkunu ikkonsidrati.

L-annimali parenti (p) għandhom ikunu f'età ta' madwar 5 sa 9 ġimgħat qabel il-bidu tad-doża. L-annimali tal-gruppi kollha tat-test għandhom, kemm jista' jkun prattikabbli, ikunu ta' piż u età uniformi.

▼B

1.4 PROĊEDURA

1.4.1 **In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Kull grupp tat-test u tal-kontroll għandu jinkludi numru suffiċjenti ta' annimali sabiex iforni, preferibbilment mhux anqas minn 20 mara tqila, jew qrib tal-parturazzjoni. Għal sustanzi li jikkaġunaw effetti mhux mixtieqa kif relatati mat-trattament (eż. sterilità, tossiċità eċċessiva f'doża għolja), dan jista' ma jkunx possibbli. L-għan huwa li jipproduċi tqalat biż-żejjed sabiex jassiguraw evalwazzjoni li tagħmel sens dwar il-potenzal tas-sustanza li taffettwa l-fertilità, it-tqala jew l-imġieba materna u wkoll l-irdiegħ, it-tkabbir u l-iżvilupp tal-wild F1 mill-konċepiment sal-maturità, u l-iżvilupp tal-botom tagħhom (F2) sa kemm ikunu mfattma. Għalhekk, nuqqas li jkun milħuq in-numru mixtieq ta' annimali tqal (i.e. 20) mhux neċessarjament jiżvalida l-istudju u għandu jkun evalwat fuq il-bażi ta' każ b'każ.

1.4.2 **Preparazzjoni tad-doża**

Huwa rakkommandat li s-sustanza tat-test tkun somministrata oralment (ma l-ikel, ma l-ilma tax-xorb, jew b'ikel sfurzat) sakemm rotta oħra ta' l-amministrazzjoni (eż. dermali jew man-nifs) tkun ikkonsidrata aktar xierqa.

Meta meħtieġ, is-sustanza tat-test tkun imdewwba jew sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkommandat li, kull meta possibbli, l-użu ta' taħlita/-sospenzjoni akwea tkun meqjusa bħala l-ewwel għażla, sewgeita bil-kunsiderazzjoni ta' taħlita/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħirrum) w imbagħad b'xi taħlita oħra f'mezzi oħrajn. Għal likwidi oħrajn apparti milli l-ilma, il-karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. L-istabbilità tas-sustanza tat-test fil-mezz għandha tkun determinata.

1.4.3 **Id-Doża**

Mill-anqas tlett livelli ta' dożi u l-kontroll simultanju għandhom ikunu użati. Sakemm ma tkunx limitata bin-natura fiżiko-kimika jew fl-effetti bioloġiċi tas-sustanza tat-test, l-għola livell ta' doża għandu jkun magħżul bil-għan li jinduċi tossiċità imma mhux il-mewt jew xi sofferenza qawwija. Fil-każ ta' mewt mhux mistennija, l-istudji b'rata ta' mortalità ta' anqas minn madwar 10 fil-mijja fl-annimali parentali (P) tkun normalment xorta waħda aċċettabbli. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħżulha bil-għan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett ħażin mhu osservat (NOAEL). Tnejn- sa erba intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożi. Għal-studju djetarji, l-ibtervall tad-doża m'għanduk ikun ta' aktar minn tlett darbiet. Il-livelli tad-doża għandhom ikunu magħżula billi tkun meqjusa l-informazzjoni eżistenti tat-tossiċità, speċjalment ir-riżultati minn studji repetuti tad-doża. Kwalunkwe informazzjoni disponibbli dwar il-mataboliżmu u l-kinetiki tal-kompost tat-test jew tal-materjali relatati għandhom ukoll ikunu ikkunsidrati. Din l-informazzjoni għandha wkoll tgħin fid-demostrazzjoni ta' l-adekwatezza ta' L-amministrazzjoni tad-dożar.

▼B

Dan il-grupp għandu jkun grupp ta' kontroll ittrattat taparsi jew mezz ta' grupp ta' kontroll jekk mezz ikun użat fl-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test. Apparti milli għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ukoll ikunu mqandla b'manjera identika għas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk ikun użat mezz, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi il-mezz fl-għola volum użat. Jek sustanza tat-test hija somministrata ma l-ikel, u toħloq tnaqqis ta' l-ammont djetarju jew ta' l-utilizzazzjoni, allura l-użu ta' grupp ta' kontroll mitmugħa bħala par jista' jkun ikkunsidrat bħala meħtieġ. L-informazzjoni alternattiv minn studji tal-kontroll iddisinjati għall-evalwazzjoni ta' l-effetti ta' konsum imnaqqas ta' l-ikel fuq il-parametri riproduttivi tista' tkun użata minflok il-grupp konkorrenti li jkunu mitmugħa bħala par.

Konsiderazzjoni għandha tkun mogħtija lil dawn il-karatteristiċi li ġejjin dwar il-mezz jew xi addittivi oħrajn: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu joħolqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ilma jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.4.4 **Test tal-limitu**

Jekk studju orali f'livell ta' doża waħda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/kull jum jew, għall-amministrazzjoni ta' l-ikel jew ilma tax-xorb, persentaġġ ekwivalenti fid-dieta jew fl-ima tax-xorb bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċu l-ebda effetti tossiċi osservabbli la fl-annimali parentali u l-anqas fil-wild tagħhom u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija kif ibbażata fuq informazzjoni minn komposti strutturament u/jew metabolikament relatati, allura studju sħiħ bl-użu ta' diversi livelli tad-doża jistgħu ikunu meqjusa bħala mhux meħtieġa. It-test tal-limitu huwa applikabbli apparti minn meta l-eposizzjoni umana tindika il-ħtieġa għal doża orali għola fil-livell użat. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma hija l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza tat-test, bħal kemm tinħall, ta' spiss tista' tindika u tillimita l-livell massimu attenibbli ta' l-espożizzjoni.

1.4.5 **Amministrazzjoni tad-doża**

L-annimali għandhom jingħataw id-doża bis-sustanza tat-test fuq il-bażi ta' 7-ijiem-fil-ġimgħa. Ir-rotta orali ta' l-amministrazzjoni (ma l-ikel, fl-ilma tax-xorb, jew bi tmiegħ sfurżat) hija preferuta. Jekk rotta oħra ta' l-amministrazzjoni hija użata, ġustifikazzjoni għandha tkun ipprovduta, u l-modifika xierqa jistgħu ikunu meħtieġa. L-annimali kollha għandhom jingħataw id-doża bl-istess metodu matul il-perjodu sperimentali kif xieraq. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata bi tmiegħ sfurzat, dan għandu jsir bl-użu ta' tubu ta' l-istonku. Il-volum ta' likwidu amministrat f'darba waħda m'għandux jeċċedi 1 ml.100 g piż tal-ġisem (4,4 ml/100 g piż tal-ġisem huwa l-massimu għaż-żejt tal-qamħ-ir-rum), apparti milli fil-każ ta' taħlitiet akweji meta 2 ml/100 g piż tal-ġisem jista' jkun użat. Apparti milli għal sustanzi irritanti jew korrossivi, li normalment ikununjiżvelaw effetti eżasperanti b'konċentrazzjonijiet għola, varjabbilità fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni sabiex tassigura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Fl-istudju bit-tmiegħ sfurzat, il-frieħ ikunu normalment jirċievu biss is-sustanza tat-test b'mod inderett minn meta jkunu jerdgħu, sakemm id-doża diretta tkun tibda għalihom meta jkunu miftuma. Fl-istudji tat-dieta jew ta' l-ilma tax-xorb, il-frieħ ikunu addizzjonalment jirċievu s-sustanza tat-test direttament meta huma jibdew jieklu waħedhom matul l-aħħar ġimgha tal-perjodu tal-lattazzjoni.Għal sustanzi amministrati permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, huwa importanti li jkun assigurat li l-kwantitajiet tas-sustanza tat-test kif involuti ma jkunux jinterferixxu nat-nutriment normali jew mal-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata fid-dieta, konċentrazzjoni djetarja kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal, jista' jkun użat; il-mod alternattiv użat għandu jkun speċifikat. Għal sustanza somministrata bi tmiegħ sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija

▼B

f'ħinijiet simili ta' kull jum, u aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa sabiex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Informazzjoni rigward id-distribuzzjoni plaċentali għandha tkun ikkonsidrata meta tkun aġġustata d-doża fi tmiegħ sfurzat ibbażżata fuq il-piż.

1.4.6 **Skedi sperimentali**

Id-doża ta' kull jum ta' l-irġiel u n-nisa parentali (P) għandha tibda meta dawn ikollhom età ta' 5 sa 9 ġimgħat. Id-doża ta' kull jum fl-irġiel u n-nisa F1 għandha tibda meta jkunu miftuma; din għandha tkun imfakkra fil-każi ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, espożizzjoni diretta tal-frieħ F1 għas-sustanza tat-test tista' diġa tkun seħħet matul il-perjodu tal-lattazzjoni. Għaż-żewġ sessi (P u F1), id-doża għandha tibqa għal mill-anqas 10 ġimgħat qabel il-perjodu tat-tgħammir. Id-doża tinżamm kontinwa għaż-żewġ sessi matul il-perjodu ta' ġimgħatejn waqt it-tgħammir. L-irgiel għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk u eżaminati meta ma jkunux aktar meħtieġa għall-assessjar ta' l-effetti riproduttivi.

Rigward in-nisa parentali (P), id-doża għandha tinżamm kostanti matul it-tqala u sal-ftim tal-frieħ F1. Konsiderazzjoni għandha tingħata għall-modifiki fl-iskeda tad-doża ibbażati fuq l-informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test, inklużi d-dettalji eżistenti tat-tossiċità, l-induzzjoni tal-metaboliżmu jew tal-bioakkumulazzjoni. Id-doża lil annimali individwali għandha normalment tkun ibbażata fuq id-determinazzjoni tal-piż tal-ġisem kif l-aktar riċenti disponibbli. B'dana kollu, attenzjoni għandha tkun eżerċitata meta tkun aġġustata d-doża matul l-aħħar parti tremestra tat-tqala. It-trattament ta' l-irġiel u n-nisa P u F1 għandha tibqa sat-terminu.L-irġiel u n-nisa P u F1 adulti kollha għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk meta ma jkunux aktar meħtieġa dwar l-assessjar ta' l-effetti riproduttivi. Il-frieħ F1 mhux magħżula għat-tgħammir u l-frieħ kollha F2 għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk wara li jkunu nfatmu.

1.4.7 **Priċedura tat-tgħammir**

1.4.7.1 *It-tgħammir parentali (P)*

Għal kull tgħammir, kull mara għandha tkun imqiegħda ma raġel wieħed mill-istess livell ta' doża (tgħammir 1: 1) sakemm iseħħ il-kopulazzjoni jew wara li jkunu skadew 2 ġimgħat. Ta' kull jum, in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' buq vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala huwa definit bħala l-jum ta' meta tapp vaġinali jew sperma jkunu misjuba. Fil-każ li l-par ma jirnexxix, it-tgħammir mill-ġdid ta' nisa ma rġiel diġa ippruvari ta' l-istess grupp jista' jkun ikkunsidrat. Pari mgħammra għandhom ikunu kjarament identifikati f'dik id-data. It-tgħammir ta' aħwa għandu jkun evitat.

▼B

1.4.7.2 *Tgħammir F1*

Għat-tgħammir ta' l-ulied F1, mill-anqas raġel wieħed u mara waħda għandhom ikunu magħżula mal-ftiem minn kull boton għal tgħammir ma frieħ oħrajn ta' l-istess livell ta' doża imma minn boton differenti, sabiex jipproduċu l-ġenerazzjoni F2. L-għażla tal-frieħ minn kull boton għandha tkun kif jinzerta meta l-ebda differrenzi sinifikanti ma jkunu osservati fil-piż tal-ġisem jew fid-dehra, bejn is-sieħba fl-istess botom. Fil-każ li differrenzi jkunu osservati, laħjar rapreżentattivi minn kull botom għandhom ikunu magħżula. B'mod pragmatiku, dan laħjar isir fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem imma jista' jkun aktar xieraq fuq il-bażi ta' l-apparenza. Il-wild F1 m'għandux ikun mgħammar sakemm ikunu laħqu l-maturità sesswali kollha. Pari mingħajr proġenità għandhom ikunu evalwati sabiex tkun determinata l-kawża apparenti ta' l- infertilità. Dan jista' jinvolvi tali proċeduri bħala opportunitajiet addizzjonali saniex jitgħammru ma nisa jew irġiel oħrajn li diġa kienu taw provam b'eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi riproduttivi, u l-eżaminazzjoni ċikli ta' l-eteru jew ta' l-ispermatoġeneżi.

1.4.7.3 *It-tieni tgħammir*

F'ċerti okkażżjonijiet, bħala ma huma aterazzjoni relatati mat-trattament fid-daqs tal-botom jew fl-osservazzjoni ta' effett ekwivoku fl-ewwel tgħamir, huwa rakkommandabbli li l-adulti P jew F1 ikunu mgħammra mill-ġdid sabiex jipproduċu it-tieni botom. Huwa rakkommandabbli li jkunu mgħammra mill-ġdid in-nisa u l-irġiel, li ma jkunux ipproduċew botom meta mgħammra ma oħrajn diġa bi prova mis-sess oppost. Jekk il-produzzjoni tat-tieni botom tkun meqjusha bħala meħtieġa f'waħda mill-ġenerazzjonijiet, l-annimali għandhom ikunu m, għammra mill-ġdid fi żmien madwar ġimgħa wara l-ftim ta' l-aħħar botom.

1.4.7.4 *Id-daqs tal-botom*

L-annimali għandhom jitħallew li jipproduċu l-botom b'mod normali u li jkabbru t-tfal tagħhom sal-ftim. Standardizzazzjoni tad-daqs tal-botom hija volontarja. Meta ssir l-istandardizzazzjoni, il-metodu użat għandu jkun deskritt fid-dettall.

1.5 OSSERVAZZJONIJIET

1.5.1 **Osservazzjonijiet kliniċi**

Ossevazzjoni klinika ġenerali għandha ssir ta' kull jum u, fil-każ ta' tmiegħ tad-doża b'mod sfurzat, il-ħin tiegħu għandu jkun meqjus fl-għola perjodu antiċipat ta' l-effetti ta' wara d-doża. Tibdiliet fl-imġieba, sinjali ta' parturazzjoni diffiċli jew imtawwla u s-sinjali kollha ta' tossiċità għandhom ikunu irreġistrati. B'żieda, eżaminazzjoni aktar dettaljata ta' kull annimal għandha tkun imwettqa fuq bażi ta' mill-anqas darba fil-ġimgħa u tista' tkun imwettqa b'mod konvenjenti fl-okkażżjoni ta' meta l-annimal ikun miżun. Darbtejn kull jum, matul tmiem il-ġimgħa darba kull jum, meta xieraq, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u l-mortalità.

▼B

1.5.2 **Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/ilma fl-annimali parenti**

L-annimali parentali (P u F1) għandhom ikunu miżuna fl-ewwel jum tad-doża u mill-anqas darba fil-ġimgħa minn hemm il-quddiem. Nisa parentali (P u F1) għandhom ikunu miżuna bħala minimu fil-jiem tal-gestjoni 0, 7, 14, u 20 jew 21, u matul il-jiem meta jreddgħu jew fl-istess jiem bħal meta jsir l-użin tal-botom u fil-jum ta' meta l-annimali jkunu maqtula. Dawn l-osserbazzjonijiet għandhom ikunu irrapurtati individwalment għal kull annimal adult. Matul il-pperijodi ta' qabel it-tgħammir u tal-ġestjoni, il-konsum ta' l-ikel għandu jkun imkejjel mill-anqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ilma għandu jkun imkejjel bħala minimu jekk is-sustanza tat-test tkun somministrata fl-ilma.

1.5.3 **Iċ-ċikli esteru**

It-tul taċ-ċiklu esteru u n-normalità huma evalwati fin-nisa P u F1 b'ti1pisa vaġinali qabel ma jsir it-tgħammir, u l-aħjar waqt it-tgħammir, sakemm tkun instabet evidenza tat-tgħammir. Meta jkunu akkwistati ċ-ċelloli vaġinali ċervikali, attenzjoni għandha tingħata sabiex ikun evitat li ċaqlieq tal-mukuża u sussegwentament, l-induzzjoni ta' psewdo-tqala (1).

1.5.4 **Parametri ta' l-isperma**

L-irġiel P u F1 kollha, waqt it-teminazzjoni, il-piż tat-testis u ta' l-epididimi għandu jkun irreġistrat u kull wieħed mill-organi preservati għal eżaminazzjoni ħistopatoloġika (ara s-sezzjoni 1.5.7, 1.5.8.1). Minn subset ta' mill-anqas għaxart irġiel ta' kull grupp P u F1, il-kumplament tat-testes u l-epididimidi għandhom ikunu użati għall-ennumerazzjoni ta' l-ispermatidi omoġenizzazzjoni-reżistenti u tar-riservi ta' l-isperma tal-cauda epididimali, rispettivament. Għall-istess subset ta' rġile, l-isperma mill-cauda epididymides jew vas deferens għandhom ikunu miġbura għall-evalwazzjoni tal-motilità ta' l-isperma u l-morfoloġija ta' l-isperma. Jekk l-effetti relatati mat-trattament huma osservati jew meta jkun hemm evidenza minn studji oħrajn ta' effetti possibbli fuq l-ispermatoġeneżi, l-evalwazzjoni ta' l-isperma tista' tkun imwettqa fuq l-irġiel kollha f'kull grupp ta' doża; altrimenti l-enumerazzjoni tista' tkun ristretta fuq l-irġiel P u F1 tal-kontroll u dawk ta' doża għolja.

In-numru totali ta' spermatidi testikulari reżistenti-omogenizzazzjoni u l-isperma cauda epididimali għandhom ikunu innumerati (2) (3). Ir-riservi ta' l-isperma cauda jistgħu ikunu derivati mill-konċentrazzjoni u l-volum ta' l-isperma f'sospenzjoni użata sabiex ikunu mwettqa kompletament l-evalwazzjonijiet kwalitattivi, u n-numru ta' sperma rkuprat minn tgħaffiġ u/jew omoġenizzazzjoni sussegwenti tal-kumplament tal-materja cauda. L-enumerazzjoni għandha tkun imwettqa fuq subset magħżul ta' rġiel tal-gruppi ta' dożi kollha immedjetament wara l-qtil ta' l-annimali sakemm ma jkunx hemm ir-rekordings bil-video jew diġitali, jew sakemm il-kampjuni jkunu ffriżati għal analiżi aktar tard. F'dawn il-każi, il-grupp tal-kontrolli u tad-doża għolja għandhom ikunu analiżżati l-ewwel. Jekk l-ebda effetti reletatati mat-trattament (eż. effetti fuq l-għadd ta' l-isperma, il-motilità, jew il-morfoloġija) jkunu jidhru, il-gruppi tad-dożi l-oħrajn ma jkunx hemm ħtieġa li jkunu analizzati. Meta l-effetti relatati mat-trattament ikunu innotati fil-grupp ta' doża għolja, allura l-gruppi fid-doża aktar baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati.

▼B

Il-motilità epididimala (jew ductus deferens) għandha tkun evalwata jew irreġistrata fuq video immedjetament wara s-sagrifiċju. L-isperma għandha tkun irkuprata waqt li tkun minimiżżata l-ħsaram u mrattba għall-analiżi tal-motilità bl-użu ta' metodi accettabbli (4). Il-persentaġġ ta' sperma motilment progressiva għandu jkun determinat jew suġġettivament jew inkella oġġettivament. Meta l-analiżi ta' moviment mgħajjun mill-computer hija mwettqa (5) (6) (7) (8) (9) (10) id-derivazzjoni tal-motilità progressive tkun tistrieħ fuq il-għatbiet definiti bl-użu għal passaġġ ta' veloċità medja u l-linja dritta jew l-indiċi lineari. Jekk il-kampjunu jkun ġew fotografi fuq videotape (11) jew l-immapini ikunu b'mod ieħor reġistrati fil-waqt tan-nekropsija, analiżi sussegwenti biss ta' l-irġiel P u F1 tal-kontroll u ta' doża għolja tista' tkun imwettqa, sakemm ma jkunx osdservati l-effetti relatati mat-trattament; f'dak il-każ, il-gruppi tad-doża l-baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati. Fin-nuqqas ta' imaġġini video jew diġitali, il-kampjuni kollha fil-gruppi tat-trattament għandhom ikunu analiżżati man-nekropsija.

Evalwazzjoni morfoloġika tal-kampjun ta' l-isperma epididimali (jew van deferens) għandha tkun imwettqa. L-isperma (jew mill-anqas 200 kull kampjun) għandha tkun eżaminata kif stabbilita, preparazzjonijiet niedja (12) u klassifikata bħala jew normali in annormali. L-eżempji ta' l-annormalitajiet ta' l-isperma morfoloġika jkunu jindikaw fużjoni, irjus iżolati, u rjus u/jew denb mingħajr forma. L-evalwazzjoni għandha tkun imwettqa fuq subjet ta' rġile magħżula fil-gruppi tad-dożi kollha jew immedkjetament wara l-qtil ta' l-annimali, jew, ibbażati fuq ir-rekordings tal-video jew diġitali, f'ħin aktar tard. It-tiċpis, la darna stabbilit, jista' wkoll ikun moqri aktar tard. F'dawn il-każi, il-grupp tal-kontrolli u tad-doża għolja għandhom ikunu analiżżati l-ewwel. Jekk l-ebda effetti reletatati mat-trattament (eż. effetti fuq l-għadd ta' l-isperma, il-motilità, jew il-morfoloġija) jkunu jidhru, il-gruppi tad-dożi l-oħrajn ma jkunx hemm ħtieġa li jkunu analizzati. Meta l-effetti relatati mat-trattament ikunu innotati fil-grupp ta' doża għolja, allura l-gruppi fid-doża aktar baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati.

Jekk uħud mill-parametri ta' hawn fuq dwar l-evalwazzjoni ta' l-isperma jkunu diġa ġew eżaminati bħala parti minn studju sistematiku tat-tossiċità ta' mill-anqas 90 jum, dawn ma jkunu neċċessarjament jeħtieġu li jkunu repetuti fl-istidju ta' żewġ ġenerazzjonijiet. l-kampjuni jew ir-reġistrazzjoni diġitali ta' l-isperma tal-ġeberazzjoni P jkunu maħżuna, sabiex jiffaċilitaw evalwazzjoni fil-quddiem.

1.5.5 **Il-wild**

Kull botom għandu jkun eżaminat malajr kemm jista' jkun possibbli wara l-ħlas (jum tal-attazzjoni 0) sabiex ikun stabbilit in-numru u s-sess tal-frieħ, imweldin mejta, imweldin ħajjin, u il-preżenza ta' annomalitajiet kbar. Frieħ misjuba mejta fil-jum), jekk mhux maċerati, għandhom preferibbilment ikunu eżaminati għal difetti possibbli u l-kawża tal-mewt, u għandhom ikunu preservati. Frieħ ħajjin għandhom ikunu magħduda u miżuna individwalment mat-twelid (jum 0 tal-lattazzjoni) jew fil-jum 1, u fil-jiem regolati ta' l-użin minn hemm il-quddiem, eż. fil-jiem 4, 7, 14, u 21 tal-lattazzjoni. Annormalitajiet fiżiċi jew ta' l-imġieba osservati fl-ommijiet jew fil-frieħ għandhom ikunu reġistrati.

▼B

L-iżvilupp fiżiku tal-frieħ għandu jkun irreġistrat l-aktar biż-żieda fil-piż tal-ġisem. Parametri fiżiċi oħrajn (eż. il-fetħa ta' l-għajnejn u l-widnejn, il-ħruġ tas-snien, it-tkabbir tax-xagħar) jista' jformi informazzjoni supplementari, imma dawn id-dettalji għandhom preferibbilment ikunu evalwati fil-kuntest tad-dettalji tal-maturità sesswali (eż. l-età u l-piż tal-ġisem jew il-fetħa vaġinali jew is-separazzjoni balano-preputial) (14). Investigazzjonijiet funzjonali (eż. attivita motorili, funzjoni sensitorja, ontoġenija relfettiva) tal-ferħ F1 qabel u/jew wara l-ftim, partikolarment dawk relatati mal-maturità sesswali, huma rakkommandati jekk tali investigazzjonijiet ma jkunux inklużi fi studju separati. L-età tal-ftuħ vaġinali u s-separazzjoni prepuzjali għandha tkun determinata għal dawk imfatma F1 magħżula għat-tgħammir, Distanza anoġenitali għandha tkun imkejla fil-jum 0 ta' wara t-twelid fil-frieħ F2 jekk istigata b'alterazzjonijiet fir-relattività tas-sess F1 jew bil-kalkolu tal-maturità sesswali.

Osservazzjonijiet funzjonali jistgħu ikunu mħollija barra fi gruppi li altrimentri jiżvelaw sinjali ċari ta' effetti ħżiena (eż. tnaqqis sinifikanti fl-akkwist tal-piż, eċċ.). Jekk l-investigazzjonijiet funzjonali jkunu mwettqa, dawn m'għandhomx isiru fuq il-frieħ magħżula għat-tgħammir.

1.5.6 **Nekropsija maġġuri**

Fil-waqt tat-terminazzjoni jew tal-mewt matul l-istudji, l-annimali parentali kollha (P u F1), il-frieħ kollha b'annormalitajiet esterni jew sinjali kliniċi, kif ukoll wieħed magħżul b'mod kif jinzerta, ferħ/-sess/botom, miż-żewġ ġenerazzjonijiet F1 u F2, għandu jkun eżaminat b'mod makroskopiku għal xi annormlitajiet structurali jew tibdil patiloġiku. Attenzjoni speċjali għandha tingħata lill-organi tas-sistema riproduttiva. Il-frieħ li jinqatlu b'mod umanesk f'kundizzjoni morbonda u l-frieħ mejta, meta ma jkunux maċerati, għandhom ikunu eżaminati għal difetti possibbli u/jew il-kawża tal-mewt, u ippreservati.

L-uteri tan-nisa li jkun għadhom mhux mgħammra għandhom ikunu eżaminati, f'tali manjera li ma tikkompromettix l-evalwazzjoni ħistopatoloġika, għall-preżenza u n-numru ta' siti ta' l-implantazzjoni.

1.5.7 **Il-piż ta' l-organi**

Fil-waqt tat-terminazzjoni, il-piż tal-ġisem u l-piż ta' dawn l-organi li ġejjin fl-annimali P u F1 parentali kollha għandu jkun determinat (l-organi bħala pari għandhom ikunu miżuna individwalment):

— l-utru, l-ovarji;

— it-testi, l-epididimidi (total u cauda);

— il-prostata';

— il-bużżieqa seminali bil-glandoli koaġjulanti u l-fluwidi tagħhom u l-prostata (bħala unità waħda);

— il-moħħ, il-fwied, il-kliewi, il-milsa, il-glandola pitwarja, it-tirojde u l-glandoli adrenali u dawk l-organi fil-mira kif maagħrufa.

Il-piżijiet ta' l-iġsma fit-terminazzjoni għandhom ikunu determinati għall-frieħ Fċ u F2 li huma magħżula għan-nekropsija. Dawn l-organi li ġejjin minn ferħ/sess/botom magħżula kif jinzerta (ara s-sezzjoni 1.5.6) għandhom ikuinu miżuna.

▼B

Il-moħħ, il-milsa u t-timu. Ir-riżultati tan-nekropsija ġenerali u l-piż ta' l-organi għandhom ikunu assessjati fil-kuntest ma l-osservazzjonijiet magħmula fi studji oħrajn ta' dożi repetuti, meta prattikabbli.

1.5.8 **Histopatoloġija**

1.5.8.1 *Annimali parentali*

L-organi u l-biċċiet li ġejjin ta' l-annimali parentali (P u F1), jew il-kampjuni rappreżentattivi tagħhom, għandhom ikun stabbiliti u maħżuna f'medja xierqa għall-eżaminazzjoni ħistopatoloġika.

— il-vaġina, l-utru bil-għonq, u l-ovarji (ippreservati ġo fissant xieraq);

— waħda mit-testi (ippreservata fil-fissattiv Bouis jew komparabbli), waħda minn ħaġa: epididima, l-borża seminali, l-prostata, u l-glandola koaġjulanti;

— oragnu(i) tal-mira preċedentament identifikati mill-annimali kollha P u F1 li huma magħżula għat-tgħammir.

Ħistopatoloġija sħiħa tal-organi u l-biċċiet presevati elenkati hawn fuq għandha tkun imwettqa għad-dożi l-għoljin kollha u l-annimali P u F1 magħżula għat-tgħammir. L-eżaminazzjoni ta' l-ovarji fl-annimali P hija voluntarja. L-organi li juru tibdiliet relatati mat-trattament għandhom ukoll ikunu eżaminati fil-gruppi tad-doża l-baxxa u l-medja sabiex jgħinu fl-eluċidazzjoni tal-NOAEL. B'żieda, l-organi riproduttivi fl-annimali tad-doża baxxa u medja li huma issuspettati b'fertilità mnaqqsa, eż. dawk li ma jirnexxilhomx jitgħammru, li jkunu tqal, l-irgiel li ma jimpregnawx, jew li jwelldu frieħ b'saħħithom, jew dawk li ċ-ċikliċità estera jew in-numru ta' l-isperma, l-motilità, jew il-mofoloġija tagħhom kienet affettwata, għandhom ikunu suġġetti għal evalwazzjoni ħistopatoloġika. Il-ferita kbar kollha bħal ma huma l-atrofija jew it-tumuri għandhom ikunu eżaminati.

Eżaminazzjoni ħistopatoloġika testikulati dettaljata (e.g, bl-użu tal-fissattiv Bouin, it-twaħħil bill-paraaffin u s-sezzonijiet transervsjali ta' 4-5 μm ħxuna) għandhom ikunu mwettqa sabiex ikunu identifikati l-effetti relatati mat-trattament bħal ma huma l-ispermatidi miżmuma, is-saffi jew it-tipi nieqsa mil-ġermi taċ-ċelloli, iċ-ċelloli kbar multinukleati jew it-tgħaffiġ taċ-ċelloli spermatoġeniċi fil-lumen (14). L-eżami ta' l-epididimi intatta għandu jinkludi il-kaput, il-korp u l-kaanula, li jista' jkun imwettaq bl-evalwazzjoni tas-sezzjoni longitudinali. L-epididimi għandha tkun evalutata għall-infiltrazzjoni lewkoċita, tibdil fil-prevalenza tat-tipi taċ-ċelloli, it-tipi ta' ċelloli aberrenti, u l-isperma patoġikitożi. Il-PAS u t-tbgħajja ħematossilini jistgħu ikunu użati għall-eżaminazzjoni ta' l-organi riproduttivi maskili.

L-ovarju postlaktatjonali għandu jkollu l-folliki primordjali u tat-tkabbir kif ukoll il-corpora lutea l-kbira tal-lattazzjoni. L-eżaminazzjoni ħistopatoloġika għandha tiżvela t-tnaqqis kwalitattiv tal-popolazzjoni tal-follika primordjali. Evalwazzjoni kwantitattiva tal-folliki primordjali għandha tkun imwettqa għall-femminili F1; in-numru ta' l-annimali, l-għażla tas-sezzjoni ovarja, u s-sezzjoni tad-daqs tal-kampjun għandha tkun statistikament xierqa għall-proċedura ta' l-evalwazzjoni użata. L-eżaminazzjoni għandha tinkludi l-ennumerazzjoni tan-numru tal-folliki primordjali, li jistgħu ikunu aggrupparti mal-filliki ż-żgħar tat-tkabbir, għal paragun ta' l-ovarji ittrattati u tal-kontrol (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2 *Frieħ mhux miftuma*

Il-partijiet ferm annormali u l-organi tal-mira mill-frieħ kollha b'annormallitajiet esterni jew sinjali kliniċi, kif ukoll minn wieħed mill-grupp ferħ/sess/botom magħżul kif jinzerta miż-żewġ ġenerazzjonijiet F1 u F2 li ma jkunux ġew magħżula għat-tgħammir, għandhom ikunu iffissati u maħġżuna f'medja xierqa għall-eżaminazzjoni ħistopatoloġika. Il-karatteristika sħiħa ħistopatoloġika talpartijiet ippreservati għandha tkun imwettqa b'enfasi speċjali dwar l-organi tas-sistema reproduttiva.

2. **DATA**

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Id-dettalji għandhom ikunu irrapurati individwalment għan-nisa kif ukoll għall-wild tagħhom u miġbura b'sommarju f'għamla tabulari, li juru għal kull grupp tat-test u għal kull ġenerazzjoni, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-ħin ta' xi mewt jew qtil umanitarju, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità kif osservati, inkluż il-ħin ta' meta tkun skoppjat, it-tul ta' żmien, u s-severità ta' xi effetti tossiċi, it-tiġ ta' l-osservazzjonijiet ta' l-embrijuni/feti, u l-informazzjoni l-oħra kollha dwar it-trabi l-oħrajn.

Metodu statistiku ġeneralment aċċettabbli għandu jkun użat' il-metodi statistiċi għandhom ikunu magħżula bħala parti mid-disinn għall-istudju u għandhom ikunu iġġustifikati. Il-mudelli statistiċi birreazzjoni tad-doża jistgħu ikunu utili għad-data ta' l-analiżi. Ir-rapport għandu jinkludi informazzjoni suffiċjenti dwar il-metodu ta' l-analiżi u l-programm tal-kompjuter użat, hekk li riveditur/statistiku independenti jkun jista' jevalwa mill-ġdid u jikkostitwixxi mill-ġdid l-analiżi.

2.2 EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossiċità riproduttiva fuq żewġ ġenerazzjhonijiet għandu jkun evalutat f'termini ta' l-effetti osservati, inklużi s-sejbiet tan-nekropsija u mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni, jew in-nuqqas tagħha, bejn id-doża u s-sustanza tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità ta' l-annormalitajiet, inklużi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, il-fertilità affettwata, l-annormalitajiet kliniċi, l-imġieba tar-riproduzzjoni u l-botom affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħrajn. Il-propjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza tat-test, u meta disponibbli, id-dettalji tossikokinetiċi għandhom ikunu meqjusa fil-kunsiderazzjoni meta jkunu evalutati r-riżultati tat-test.

Test tat-tossiċità riproduttiva imwettqa kif suppost għandu jipprovdi estimi sodisfaċenti tal-livbell bla ebda effett u rikonoxximent ta' l-effeti ħżiena fuq ir-riproduzzjoni, l-parturizzjoni, il-lattazzjoni, l-iżvilupp postnatli inkluż it-tbakkir u l-iżvilupp sesswali.

▼B

2.3 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Studju tat-tossiċita riproduttiva fuq żewġ ġenerazzjonijiet għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' l-espożizzjoni ripetuta ta' sustanza matul il-fażijiet kollha taċ-ċiklu riproduttiv. Partikolarment, l-istudju jipprovdi informazzjoni dwar il-parametri riproduttivi, u dwar l-iżvilupp, it-tlabbir, il-maturità u s-sopravvivenza tal-frieħ. Ir-riżultati ta' l-istudju għandhom ikunu interpretatai b'konnessjoni mas-sejbier mill-istudji subkroniku, riproduttivi, tossikokinetiċi u studji oħrajn. Ir-riżultati ta' dan l-istudju jistgħu ikunu użati fl-assessjar tal-ħtieġa ta' aktar testijiet tal-kimika. L-estrapolazzjoni tar-riżultati ta' l-istudju mal-bniedem hija valida sa grad limitat. Dawn huma l-aħjar użati sabiex jipprovdu informazzjoni dwar il-livelli-mingħajr-effett u l-espożizzjoni umana (20) (21) (22) (23).

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;

— dettalji ta' l-identifikazzjoni;

— purità.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

— speċje/tipi użati;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, eċċ.;

— il-pożijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;

— dettalji tat-test tal-preparazzjoni tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza, il-konċentazzjonijiet;

— l-istabbilità u l-omoġenità tal-preparazzjoni;

— dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-konċentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali 9 mg/kg il-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

▼B

Riżultati:

— il-konsum ta' l-ikel. Il-konsum ta' l-ilma, jekk disponibbli, l-effikaċja ta' l-ikel (iż-żieda fil-piż tal-ġisem għal kull gramma ikel ikkunsmat), u l-konsum tal-materjal tat-test għall-annimali P u F1, apparti milli għall-perjodu tal-koabitazzjoni u għal mill-anqas l-aħħar terz tal-lattazzjoni;

— id-dettalji ta' l-assorbazzjoni (jekk disponibbli);

— id-dettalji tal-piż tal-ġisem dwar l-annimali P u Fċ magħżula għat-tgħammir;

— id-dettalji tal-piż tal-botom u l-frieħ individwali;

— il-piż tal-ġsem fil-waqt li jkunu sagrifikati u l-piż assolut u rtelattiv ta' l-organi għall-annimali parentali;

— in-natura, s-severità u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (sew jekk reversibbli u anki jekk le);

— il-jum tal-mewt matul l-istudju jew jekk l-annimali jkunux baqgħu ħajjin sakem maqtula;

— dettalji tar-reazzjoni tossika bis-sess u d-doża, inklużi l-indiċi tat-tgammir, il-fertilità, il-ġestazzjoni, it-twelid, il-vijabbilità, u l-lattazzjoni; ir-rapport għandu jindika n-numri użati fil-kalkoli ta' dawn l-indiċi;

— l-effetti tossiċi jew oħrajn fuq ir-riproduzzjoni, il-frieħ, it-tbabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet ħistopatoloġiċi kollha;

— in-numru ta' nisa P u F1 fiċ-ċiklu normali u t-tul taċ-ċiklu;

— it-total tan-numru ta' l-isperma cauda epididimali, il-persentaġġ progressive tal-motilità ta' l-isperma, il-persentaġġ morfoloġikament normali, u l-persentaġġ ta' l-ispetma b'kull annormalità identifikata;

— iż-żmien satotgħammir, inklużi n-numru ta' jiem sakem isir it-tgħammir;

— it-tul tal-ġestjoni;

— in-numri ta' l-impjantazzjonijiet, corpora lutea, id-daqs tal-botom;

— in-numru ta' twelid ħajjin u t-telf tal-post-impjantazzjoni;

— in-numru ta' frieħ b'annormalitajiet ferm viżibbli, jekk determinati bin-numru tal-botom, għandu jkun irraportat;

— dettalji dwar l-aċċenni fiżiċi fil-frieħ u l-informazzjoni l-oħra ta' l-iżvilupp post natali; laċċenni fiżiċi evalwati għandhom ikunu ġustifikati;

— dettalji dwar l-osservazzjonijiet funzjonali fil-frieħ u l-adulti, kif applikabbli;

— trattamentv statistiku tar-riżultati, meta xieraq.

▼B

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet, inklużi l-valuri NOAEL għall-effetti materni u fuq il-frieħ.

4. **REFERENZI**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44.

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237- 244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOSSIKOKINETIĊI**

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għat-TG 417 (2010) tal-OECD. Studji li jeżaminaw it-tossikokinetika (TK) ta' kimika għall-ittestjar isiru biex tinkiseb informazzjoni adegwata dwar l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-trasformazzjoni bijoloġika (jiġifieri l-metaboliżmu) u l-eskrezzjoni tagħha biex jgħinu tkun relatata l-konċentrazzjoni jew id-doża mat-tossiċità osservata u bħala għajnuna biex jinftiehem il-mekkaniżmu tagħha ta' tossiċità. TK tista' tgħin biex jinftiehmu l-istudji tas-tossikoloġija billi turi li l-annimali tat-test ikunu esposti b'mod sistematiku għall-kimika għall-ittestjar u billi tiżvela liema jkunu l-gruppi li jiċċirkolaw (kimika/metaboliti prinċipali). Parametri bażiċi ta' TK iddeterminati minn dawn l-istudji għandhom jipprovdu wkoll informazzjoni dwar il-potenzjal għal akkumulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'tessuti u/jew f'organi u l-potenzjal għal induzzjoni ta' trasformazzjoni bijoloġika bħala riżultat ta' espożizzjoni għall-kimika għall-ittestjar.

2. Dejta ta' TK tista' tikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-adegwatezza u r-rilevanza ta' dejta ta' tossiċità tal-annimali għal estrapolazzjoni ta' periklu għall-bniedem u/jew għal valutazzjoni tar-riskju. Addizzjonalment, studji tossikokinetiċi jistgħu jipprovdu informazzjoni utli biex ikunu ddeterminati l-livelli ta' doża għal studji dwar tossiċità (kinetika lineari vs. mhux lineari), rotta ta' effetti ta' amministrazzjoni, disponibbiltà bijoloġika u kwistjonijiet relatati ma' tifsila tal-istudju. Ċertu tip ta' dejta TK tista' tintuża fl-iżvilupp ta' mudell tossikokinetiku b'bażi fiżjoloġika (PBTK).

3. Hemm użijiet importanti għal dejta dwar metaboliti/TK bħal dawk li jissuġġerixxu tossiċitajiet possibbli u modalitajiet ta' azzjoni u r-relazzjoni tagħhom għal livell ta' doża u rotta ta' espożizzjoni. Flimkien ma' dan, dejta dwar metaboliżmu tista' tipprovdi informazzjoni utli għal valutazzjoni tas-sinifikat tossikoloġiku ta' espożizzjonijiet għal metabiliti prodotti esoġenikament tal-kimika għall-ittestjar.

4. Dejta tossikokinetika adegwata tkun utli biex issostni l-aċċettabbiltà u l-applikabbiltà ulterjuri ta' relazzjonijiet kwantitattivi ta' attività strutturata, approċċi ta' read-across jew raggruppament fl-evalwazzjoni tas-sikurezza ta' kimiċi. Dejta kinetika tista' tintuża wkoll għall-evalwazzjoni tar-rilevanza tossikoloġika ta' studji oħra (eż. *in vivo*/*in vitro*).

5. Sakemm ma tissemmiex rotta oħra ta' amministrazzjoni (ara b'mod partikolari l-paragrafi 74-78), dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa applikabbli għal amministrazzjoni orali tal-kimika għall-ittestjar.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

6. Sistemi regolatorji għandhom rekwiżiti u ħtiġijiet differenti dwar il-kejl ta' punti ta' tmiem u parametri relatati ma' tossikokinetika għal klassijiet differenti ta' kimiċi (eż. pestiċidi, bijoċidi, kimiċi industrijali). Mhux bħal Metodi ta' Ttestjar kważi kollha dan il-Metodu ta' Ttestjar jiddeskrivi l-ittestjar ta' tossikokinetika, li jinvolvi kejlijiet u punti ta' tmiem multipli. Fil-ġejjieni jistgħu jkunu żviluppati diversi Metodi ta' Ttestjar ġodda u/jew dokument(i) ta' gwida biex jiddeskrivi/u kull punt ta' tmiem separatament u f'aktar dettalji. Fil-każ ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, liema testijiet jew valutazzjonijiet isiru huwa speċifikat mir-rekwiżiti u/jew ħtiġijiet ta' kull sistema regolatorja.

▼M4

7. Hemm diversi studji li jistgħu jsiru biex tkun ivvalutata l-imġiba ta' TK ta' kimika għall-ittestjar għal finijiet regolatorji. Iżda, skont il-ħtiġijiet jew is-sitwazzjonijiet regolatorji partikolari, mhux dawn l-istudji kollha li jistgħu jkunu meħtieġa għall-evalwazzjoni ta' kimika għall-ittestjar. Il-flessibbiltà, meqjusin il-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar li tkun qed tiġi investigata, hija meħtieġa fit-tfassil ta' studji ta' tossikokinetika. F'xi każijiet, ċertu sett biss ta' mistoqsijiet jista' jkun jeħtieġlu jiġi esplorat biex ikun indirizzat tħassib dwar perikli u riskji assoċjati ma' kimika għall-ittestjar. F'xi sitwazzjonijiet, dejta dwar TK tista' tingħabar bħala parti mill-evalwazzjoni fi studji oħra ta' tossikoloġija. Għal sitwazzjonijiet oħra, jistgħu jkunu meħtieġa studji addizzjonali u/jew aktar estensivi dwar TK, skont ħtiġijiet regolatorji u/jew jekk jinqalgħu mistoqsijiet ġodda bħala parti minn evalwazzjoni ta' kimika għall-ittestjar.

8. L-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar u metaboliti u analogi rilevanti għandhom jitqiesu mil-laboratorju tal-ittestjar qabel ma jsir l-istudju biex tissaħħaħ il-kwalità tal-istudju u jkun evitat użu mhux meħtieġ ta' annimali. Dan jista' jinkludi dejta minn Metodi ta' Ttestjar rilevanti oħra (studji *in vivo*, studji *in vitro*, u/jew evalwazzjonijiet *in silico*). Proprjetajiet fiżikokimiċi, bħal koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma (espress bħala log P_{OW}), pKa, solubilità fl-ilma, pressjoni ta' fwar u piż molekulari ta' kimika jistgħu jkunu utli għall-ippjanar ta' studji u interpretazzjoni ta' riżultati. Dawn jistgħu jkunu ddeterminati billi jintużaw metodi adatti kif deskritti fil-Metodi ta' Ttestjar rilevanti.

LIMITAZZJONIJIET

9. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux imfassal biex jindirizza ċirkostanzi speċjali, bħall-annimal mara tqila jew tredda' u wildha, jew biex jevalwa residwi potenzjali f'annimali esposti li jipproduċu ikel. Iżda d-dejta miksuba minn studju B.36 tista' tipprovdi informazzjoni ta' sfond biex tiggwida t-tifsila ta' studji speċifiċi għal dawn l-investigazzjonijiet. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux maħsub għall-ittestjar ta' nanomaterjali. Rapport dwar eżami mill-ġdid preliminari ta' Linji Gwida ta' Testijiet tal-OECD għall-applikabbiltà tagħhom għal nanomaterjali jindika li t-TG 417 (ekwivalenti għal dan il-Metodu ta' Ttestjar B.36) tista' ma tkunx tapplika għal nanomaterjali (1).

DEFINIZZJONIJIET

10. Definizzjonijiet użati għall-fini ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma pprovduti fl-Appendiċi.

KONSIDERAZZJONIJIET TA' TRATTAMENT XIERAQ TAL-ANNIMALI

11. Gwida dwar trattament uman tal-annimali hija disponibbli fid-Dokument ta' Gwida (GD) 19 (2) tal-OECD. Huwa rrakkomandat li GD 19 tal-OECD ikun ikkonsultat għall-istudji kollha *in vivo* jew *in vitro* deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar.

DESKRIZZJONI tal-METODI

Studji pilota

12. L-użu ta' studji pilota bħal dawn huwa rrakkomandat u inkuraġġit għall-għażla ta' parametri sperimentali għall-istudji ta' tossikokinetika (eż. metaboliżmu, bilanċ ta' piż, proċeduri analitiċi, tiftix ta' doża, eżalazzjoni ta'CO_2, eċċ.). Karatterizzazzjoni ta' xi wħud minn dawn il-parametri tista' ma ġġibx il-ħtieġa tal-użu ta' kimiċi b'tikketta radjoloġika.

▼M4

Għażla ta' annimali

Speċijiet

13. L-ispeċi ta' annimali (u razza) użata għal ittestjar ta' TK għandha preferibbilment tkun l-istess bħal dik użata fi studji tossikoloġiċi oħra magħmulin bil-kimika għall-ittestjar ta' interess. Normalment għandu jintuża l-far minħabba li kien użat b'mod estensiv għal studji tossikoloġiċi. L-użu ta' speċi oħra jew addizzjonali jista' jkun awtorizzat jekk studji tossikoloġiċi kritiċi juru evidenza ta' tossiċità sinifikanti f'dawn l-ispeċijiet jew jekk jintwera li t-tossiċità/tossikokinetika tagħhom tkun aktar rilevanti għall-bnedmin. Għandha tingħata ġustifikazzjoni għall-għażla tal-ispeċi ta' annimal u razztu.

14. Sakemm ma jingħadx mod ieħor, dan il-Metodu ta' Ttestjar jirreferi għall-far bħala l-ispeċi tat-test. Ċerti aspetti tal-metodu jistgħu jkollhom jiġu mmodifikati biex jintużaw speċijiet oħra għal test.

Età u Razza

15. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom (normalment minn 6-12-il ġimgħa meta jsir id-dożaġġ) (ara wkoll il-paragrafi 13 u 14). Għandha tingħata ġustifikazzjoni għall-użu ta' annimali li ma jkunux adulti żgħażagħ. L-annimali kollha għandhom ikunu tal-istess età mal-bidu tal-istudju. Il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali individwalment m'għandhiex tkun aktar minn ± 20 % tal-piż medju tal-grupp tat-test. Idealment ir-razza użata għandha tkun l-istess bħal dik użata biex tkun idderivata d-database tossikoloġika għall-kimika għall-ittestjar.

Għadd u sess tal-annimali

16. M'għandhomx jintużaw anqas minn erba' annimali ta' sess wieħed għal kull doża ttestjata. Għandha tingħata ġustifikazzjoni għas-sess tal-annimali użat. Għandu jitqies l-użu taż-żewġ sessi (erba' rġiel u erba' nisa) jekk ikun hemm evidenza li ssostni differenzi sustanzjali fit-tossiċità b'rabta mas-sessi.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf

17. L-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu jgħixu individwalment matul il-perjodu tal-ittestjar. Abitazzjoni fi gruppi tista' tkun iġġustifikata f'ċirkostanzi speċjali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam. It-temperatura tal-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C (± 3 °C) u l-umdità relattiva 30-70 %. Dwar għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb.

Kimika għall-ittestjar

18. Kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika bl-użu ta' ^{14}C għandha tintuża għall-bilanċi kollha ta' massa u għall-aspetti ta' identifikazzjoni ta' metaboliti tal-istudju; iżda, jekk ikun jista' jintwera li:

— l-identifikazzjoni ta' bilanċ ta' massa u ta' metaboliti tkun tista' tiġi evalwata b'mod adegwat billi tintuża l-kimika għall-ittestjar mingħajr tikketta,

— l-ispeċifiċità u s-sensittività analitiċi tal-metodu użat ma' kimika għall-ittestjar mhux radjuattiva jkunu daqs jew akbar minn dawk li jkunu jistgħu jinkisbu bil-kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika,

▼M4

f'dak il-każ ma jkunx hemm ħtieġa li tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika. Barra dan, jistgħu jintużaw iżotopi oħra radjuattivi u stabbli, partikolarment jekk l-element ikun responsabbli għal jew ikun parti mill-porzjon tossiku tal-kimika għall-ittestjar. Jekk ikun possibbli, it-tikketta radjoloġika għandha titqiegħed f'porzjon ċentrali tal-molekula li tkun metabolikament stabbli (ma tkunx tista' tinbidel, ma titneħħiex metabolikament bħala CO_2, u ma ssirx parti mill-ġemgħa ta' karbonju biss tal-organiżmu). Tikkettar ta' siti multipli jew reġjuni speċifiċi tal-molekula jistgħu jkunu meħtieġa biex ikun segwit x'jiġri mil-kimika għall-ittestjar.

19. Il-kimiċi għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika jew mhux b'tikketta radjoloġika għandhom ikunu analizzati billi jintużaw metodi adatti biex ikunu stabbiliti l-purezza u l-identità. Il-purezza radju tal-kimika għall-ittestjar radjuattiva għandha tkun l-ogħla li tista' tinkiseb għal kimika partikolari għall-ittestjar (idealment hija għandha tkun aktar minn 95 %) u għandu jsir sforz raġonevoli biex ikunu identifikati impuritajiet li jkun hemm ta' 2 % jew aktar. Il-purezza, flimkien mal-identità u l-porzjon ta' kull impurezza li tkun ġiet identifikata, għandhom ikunu rrappurtati. Programmi regolatorji individwalment jistgħu jagħżlu li jipprovdu gwida addizzjonali bħala għajnuna għad-definizzjoni u l-ispeċifikazzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar magħmulin minn taħlitiet u metodi għad-determinazzjoni tal-purezza.

Għażla ta' doża

Studju Pilota

20. Is-soltu doża orali waħda tkun suffiċjenti għall-istudju pilota. Id-doża m'għandhiex tkun tossika, iżda tkun għolja biżżejjed biex titħalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u plażma, skont il-każ), kif ukoll biex jitħares l-għan dikjarat tal-studju pilota kif innotat fil-paragrafu 12 ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Studji Ewlenin

21. Għall-istudji ewlenin, ikun ippreferut minimu ta' żewġ dożi minħabba li informazzjoni miġbura minn mill-anqas żewġ gruppi ta' doża tista' tgħin biex tkun stabbilita doża fi studji oħra dwar tossiċità, u tgħin fil-valutazzjoni ta' doża-rispons ta' testijiet ta' tossiċità diġà disponibbli.

22. Meta jkunu amministrati żewġ dożi, iż-żewġ dożi għandhom ikunu għoljin biżżejjed biex titħalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u fil-plażma, skont il-każ). Għandha titqies informazzjoni minn dejta disponibbli dwar tossiċità għal għażla ta' doża. Jekk ma jkunx hemm informazzjoni (eż. minn studji ta' tossiċità orali akuta li jirreġistraw sinjali kliniċi ta' tossiċità, jew minn studji dwar tossiċità ta' doża ripetuta) ikun jista' jitqies valur għall-ogħla doża li tkun taħt l-istima ta' LD_{50} (rotot orali u dermali) jew LC_{50} (rotta tal-inalazzjoni) jew taħt il-valur aktar baxx tal-stima tal-firxa ta' tossiċità akuta. Id-doża aktar baxxa għandha tkun xi frazzjoni tad-doża ogħla.

23. Jekk ikun investigat livell wieħed ta' doża, idealment id-doża għandha tkun għolja biżżejjed biex titħalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u fil-plażma, skont il-każ), filwaqt li ma tkunx prodotta tossiċità li tkun tidher. Għandu jkun ipprovdut motiv għala ma jkunx ġie inkluż it-tieni livell ta' doża.

24. Jekk l-effett ta' doża fuq proċessi kinetiċi jkun jeħtieġlu jiġi stabbilit, żewġ dożi jistgħu ma jkunux suffiċjenti u mill-anqas doża waħda għandha tkun għolja biżżejjed biex tissatura dawk il-proċessi. Jekk l-erja taħt il-kurva tal-plażma ta' konċentrazzjoni-ħin (AUC) ma tkunx lineari bejn żewġ livelli ta' doża użati fl-istudju ewlieni, din tkun indikazzjoni qawwija li tkun qed isseħħ saturazzjoni ta' proċess kinetiku wieħed jew aktar xi mkien bejn iż-żewġ livelli ta' doża.

▼M4

25. Għal kimiċi għall-ittestjar ta' tossiċità baxxa, għandha tintuża doża massima ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem (rotot orali u dermali) (jekk l-amministrazzjoni tkun bir-rotta tal-inalazzjoni, irreferi għall-Kapitolu B.2 ta' dan l-Anness għal gwida; tipikament din id-doża ma tkunx taqbeż 2 mg/l). Konsiderazzjonijiet speċifiċi għal kimika jistgħu joħolqu l-ħtieġa ta' doża ogħla skont ħtiġijiet regolatorji. Għażla ta' doża għandha dejjem tkun iġġustifikata.

26. Dejta dwar doża waħda tossikokinetika u ta' distribuzzjoni ta' tessuti tista' tkun adegwati biex ikun iddeterminat il-potenzjal għal akkumulazzjoni u/jew persistenza. Iżda f'xi ċirkostanzi tista' tkun meħtieġa amministrazzjoni ta' doża ripetuta i) biex ikun indirizzat b'mod aktar sħiħ il-potenzjal għal akkumulazzjoni u/jew persistenza jew bidliet f'TK (jiġifieri, pereżempju, induzzjoni u inibizzjoni ta' enżimi) jew ii) kif ikun mitlub mis-sistema regolatorja applikabbli. Fi studji li jinvolvu dożaġġ, filwaqt li amministrazzjoni ta' doża baxxa ripetuta s-soltu tkun suffiċjenti, f'ċerti ċirkostanzi tista' wkoll tkun meħtieġa amministrazzjoni ta' doża għolja ripetuta (ara wkoll il-paragrafu 57).

Amministrazzjoni ta' Kimika għall-Ittestjar

27. Il-kimika għall-ittestjar għandha tinħall jew tiġi sospiża b'mod omoġenju fl-istess vejjikolu użat għall-istudji l-oħra dwar tossiċità ta' gavage orali magħmulin bil-kimika għall-ittestjar, jekk tkun disponibbli informazzjoni dwar vejjikolu bħal dan. Għandu jkun ipprovdut motiv għall-għażla tal-vejjikolu. L-għażla tal-vejjikolu u l-volum ta' dożaġġ għandhom jitqiesu fit-tfassil tal-istudju. Il-metodu tas-soltu ta' amministrazzjoni huwa b'gavage; iżda amministrazzjoni b'kapsula tal-ġelatina jew bħala taħlita ta' dieta tista' tkun vantaġġuża f'sitwazzjonijiet speċifiċi (fiż-żewġ każijiet għandha tingħata ġustifikazzjoni). Għandha tkun ipprovduta verifika tad-doża attwali amministrata lil kull annimal.

28. Il-volum massimu ta' likwidu li għandu jkun amministrat b'gavage orali f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimali tat-test, mit-tip ta' vejjikolu ta' doża u minn jekk jingħatax għalf jew le qabel ma tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar. Għandu jingħata l-motiv għala jkun amministrat jew ristrett ikel qabel id-dożaġġ. Normalment il-volum għandu jinżamm baxx daqs kemm ikun prattikabbli għal vejjikoli jew tal-ilma jew mhux tal-ilma. Volumi ta' doża m'għandhomx normalment ikunu aktar minn 10 ml/kg tal-piż tal-ġisem għal rodituri. Volumi ta' vejjikoli użati għal aktar kimiċi għall-ittestjar lipofiliċi jistgħu jibdew minn 4 ml/kg tal-piż tal-ġisem. Għal dożaġġ ripetut, meta l-indikazzjoni tkun li m'għandux ikun hemm sawm kuljum, għandhom jitqiesu volumi ta' doża aktar baxxa (eż. 2-4 ml/kg tal-piż tal-ġisem). Meta jkun possibbli, għandu jitqies l-użu ta' volum ta' doża konsistenti ma' dak amministrat fi studji oħra dwar gavage orali għal kimika għall-ittestjar.

29. L-amministrazzjoni intravenuża (IV) tal-kimika għall-ittestjar u l-kejl tal-kimika għall-ittestjar fid-demm u/jew l-eskreta jistgħu jintużaw biex jistabbilixxu d-disponibbilità bijoloġika jew l-assorbiment orali relattiv. Għall-istudju IV, tkun amministrata doża waħda (is-soltu ekwivalenti għad-doża orali baxxa iżda li ma taqbiżhiex – ara għażla ta' doża) ta' kimika għall-ittestjar billi jintuża vejjikolu adattat. Dan il-materjal għandu jkun amministrat f'volum xieraq (eż. 1 ml/kg bw) fis-sit magħżul ta' amministrazzjoni lil mill-anqas erba' annimali tas-sess adattat (jistgħu jintużaw iż-żewġ sessi, jekk dan ikun permess, ara l-paragrafu 16). Tkun meħtieġa preparazzjoni ta' doża maħlula kollha jew sospiża għal amministrazzjoni IV tal-kimika għall-ittestjar. Il-vejjikolu għal amministrazzjoni IV m'għandux ifixkel l-integrità tad-demm jew il-fluss tad-demm. Jekk il-kimika għall-ittestjar hija infuża,

▼M4

ir-rata ta' infużjoni għandha tkun irreġistrata u standardizzata fost l-annimali, sakemm tintuża pompa tal-infużjoni. Għandha tintuża l-anestesija jekk wieħed idaħħal tubu rqiq fil-vina ġugulari (għal amministrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar u/jew għal ġbir ta' demm) jew jekk wieħed juża l-arterja femorali għal amministrazzjoni. Għandha titqies bir-reqqa t-tip ta' anestesija minħabba li din tista' jkollha effetti fuq it-tossikokinetika. L-annimali għandhom jitħallew jirkupraw b'mod adegwat qabel amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar flimkien mal-vejjikolu.

30. Jistgħu japplikaw rotot oħra ta' amministrazzjoni, bħal dawk dermali u ta' inalazzjoni, (ara l-paragrafi 74-78) għal ċerti kimiċi għall-ittestjar, meqjusin il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħhom u l-użu jew espożizzjoni umana mistennija tagħhom.

Kejlijiet

Bilanċ tal-massa

31. Il-bilanċ tal-massa huwa ddeterminat bl-għadd tal-perċentwali tad-doża (radjuattiva) amministrata li toħroġ fl-awrina, fir-rawt u man-nifs, u bil-perċentwali li jkun hemm f'tessuti, karkassa residwali u ħasil ta' gaġeġ (ara l-paragrafu 46). Ġeneralment, irkupri totali ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) amministrata fl-ammont ta' > 90 % jitqiesu bħala adegwati.

Assorbiment

32. Stima inizjali ta' assorbiment tista' tinkiseb billi jkun eskluż il-perċentwali tad-doża fis-sistema gastrointestinali (GI) u/jew fir-rawt mid-determinazzjoni tal-bilanċ tal-massa. Għall-kalkulazzjoni tal-assorbiment ta' perċentwali, ara l-paragrafu 33. Għal investigazzjoni ta' eskreta, ara l-paragrafi 44-49. Jekk l-ammont eżatt ta' assorbiment wara li tkun ingħatat doża orali ma jkunx jista' jiġi stabbilit minn studji ta' bilanċ ta' massa (eż. fejn aktar minn 20 % tad-doża amministrata tkun fir-rawt), jista' jkun hemm ħtieġa ta' investigazzjonijiet ulterjuri. Dawn l-istudji jistgħu jikkomprendu jew 1) amministrazzjoni orali ta' kimika għall-ittestjar u kejl ta' kimika għall-ittestjar fil-bili jew 2) amministrazzjoni orali u IV ta' kimika għall-ittestjar u kejl ta' kimika għall-ittestjar netta li tkun fl-awrina magħduda l-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra flimkien mal-karkassa minn kull waħda miż-żewġ rotot. F'waħda miż-żewġ tifsiliet tal-istudju, il-kejl tar-radjuattività jsir bħala metodu sostitut għal analiżi speċifika għal kimika ta' kimika għall-ittestjar flimkien ma' metaboliti.

33. Jekk jinbeda studju dwar eskrezzjoni ta' bili, tipikament tintuża r-rotta orali. F'dan istudju, il-kanali tal-bili ta' mill-anqas erba' annimali tas-sess adattat (jew taż-żewġ sessi, jekk dan ikun permess) għandu jiddaħħlilhom tubu rqiq u għandha tkun amministrata doża waħda tal-kimika għall-ittestjar. Wara li tkun saret l-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, eskrezzjoni ta' radjuattività/kimika għall-ittestjar fil-bili għandha tkun immonitorjata sakemm jeħtieġ biex issir stima tal-perċentwali tad-doża amministrata li tkun ħarġet bħala eskreta permezz ta' din ir-rotta, li tista' tintuża biex ikun ikkalkulat direttament kemm ikun sar assorbiment orali, kif ġej:

$$\text{Assorbiment ta' perċentwali} = \frac{(\text{arjata' teħid tan} - \text{nifs} + \text{urine} + \text{'il barra} + \text{karkassa mingħajr kontenuti tas} - \text{sistema GI})}{\text{ammont amministrat}} \times 100$$

34. Għal xi klassijiet ta' kimika għall-ittestjar, sekrezzjoni diretta tad-doża assorbita tista' sseħħ f'membrani intestinali kollha. F'każijiet bħal dawn il-kejl ta' perċentwali ta' doża f'rawt wara doża orali lill-far b'tubu rqiq fil-kanal tal-bili ma jitqisx li jkun rappreżentattiv tad-doża mhux assorbita. Huwa rrakkomandat li fejn ikun maħsub li sseħħet sekrezzjoni intestinali, f'dak il-każ il-perċentwali ta' doża assorbita tkun ibbażata fuq l-assorbiment ikkalkulat mill-paragun tal-eskrezzjoni, wara li tkun saret ir-rotta orali, mar-rotta IV (far intatt jew b'tubu rqiq fil-kanal tal-bili) (ara l-paragrafu 35). Huwa rrakkomandat ukoll li meta jitqies li tkun meħtieġa l-kwantifikazzjoni tas-sekrezzjoni intestinali, jitkejjel il-far b'tubu rqiq fil-kanali tal-bili wara amministrazzjoni ta' doża IV.

▼M4

Disponibbiltà bijoloġika

35. Id-disponibbiltà bijoloġika tista' tkun iddeterminata mill-kinetika tal-plażma/tad-demm mill-gruppi orali u IV, kif deskritti fil-paragrafi 50-52, b'analiżi kimika speċifika tal-kimika għall-ittestjar u/jew ta' metabolite/i rilevanti, li, għalhekk, ma tkunx teħtieġ kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika. Il-kalkulazzjoni tad-disponibbiltà bijoloġika (F) tal-kimika għall-ittestjar jew ta' metabolite/i rilevanti tista' mbagħad issir kif ġej:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

fejn 'AUC' tkun l-erja taħt il-kurva tal-plażma ta' konċentrazzjoni-ħin, u 'exp' tkun ir-rotta sperimentali (orali, dermali jew permezz ta' inalazzjoni).

36. Għal użu f'valutazzjoni tar-riskju ta' effetti sistemiċi, id-disponibbiltà bijoloġika tal-komponent tossiku tkun ġeneralment ippreferuta flok l-assorbiment ta' perċentwali meta konċentrazzjonijiet sistemiċi minn studji dwar annimali jitqabblu ma' dejta analoga ta' monitoraġġ bijoloġiku minn studji dwar espożizzjoni ta' ħaddiema. Is-sitwazzjoni tista' ssir aktar kumplessa jekk dożi jkunu fil-firxa mhux lineari; għalhekk huwa importanti li tgħarbil tossikokinetiku jiddetermina dożi fil-firxa lineari.

Distribuzzjoni tat-Tessuti

37. Tagħrif dwar id-distribuzzjoni ta' tessuti ta' kimika għall-ittestjar u/jew il-metaboliti tagħha huwa important għall-identifikazzjoni ta' tessuti mmirati u biex wieħed jifhem il-mekkaniżmi bażiċi ta' tossiċità u tinkiseb informazzjoni dwar il-potenzjal għal akkumulazzjoni u persistenza ta' kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti. Il-perċentwali tad-doża totali (radjuattiva) f'tessuti kif ukoll ta' karkassa residwali għandhom mill-anqas jitkejlu fit-tmiem tal-esperiment ta' eskrezzjoni (eż. tipikament sa 7 ijiem wara doża jew anqas skont x'tagħmel speċifikatament kimika għall-ittestjar). Meta ma tinstab ebda kimika għall-ittestjar f'tessuti fi tmiem ta' studju (eż. minħabba li l-kimika għall-ittestjar setgħet kienet eliminata qabel intemm l-istudju minħabba nofs ħajja qasira), għandha tingħata attenzjoni biex ma jkunx hemm interpretazzjni ħażina tad-dejta. F'dan it-tip ta' sitwazzjoni, id-distribuzzjoni ta' tessuti għandha tkun investigata fil-mument tal-konċentrazzjoni massima tal-plażma/tad-demm tal-kimika għall-ittestjar (u/jew tal-metabolite) (T_{max}) jew tar-rata massima ta' eskrezzjoni tal-awrina, kif jixraq (ara l-paragrafu 38). Barra dan, il-ġbir ta' tessuti f'punti addizzjonali ta' ħin jista' jkun meħtieġ biex jiddetermina d-distribuzzjoni ta' tessuti tal-kimika għall-ittestjar u/jew tal-metaboliti tagħha, biex jevalwa d-dipendenza fuq il-ħin (fejn xieraq), biex jgħin biex ikun stabbilit bilanċ ta' massa u/jew skont kif ikun meħtieġ minn awtorità kompetenti. It-tessuti li għandhom jinġabru jinkludu l-fwied, ix-xaħam, is-sistema GI, il-kilwa, il-milsa, id-demm kollu, il-karkassa residwali, tessuti tal-organu mmirati u kwalunwke tessut ieħod (eż. tirojde, l-eritroċiti, l-organi ta' riproduzzjoni, il-ġidla, l-għajn (partikolarment f'annimali bix-xagħar) ta' sinifikanza potenzjali fl-evalwazzjoni tossikoloġika tal-kimika għall-ittestjar. L-analiżi ta' tessuti addizzjonali fl-istess punti ta' ħin għandha tiġi kkunsidrata għall-utilizzazzjoni massima tal-annimali u fil-każ li t-tossiċità tal-organu mmirat tiġi osservata fl-istudji tat-tossiċità subkronaka u kronaka. Il-konċentrazzjoni residwali (raju attiva) u l-proporzjonijiet ta' tessut-għal-plażma (demm) għandhom jiġu rreġistrati wkoll.

38. L-evalwazzjoni tad-distribuzzjoni ta' tessuti f'punti addizzjonali ta' ħin bħal fil-ħin ta' konċentrazzjoni massima ta' plażma/demm (eż. T_{max}) jew tar-rata massima ta' eskrezzjoni tal-awrina, miksuba mill-esperimenti rispettivi kinetiċi tal-plażma/demm jew ta' eskrezzjoni, tista' wkoll tkun meħtieġa jew mitluba minn awtorità kompetenti. Din l-informazzjoni tista' tkun utli biex wieħed jifhem it-tossiċità u l-potenzjal għal akkumulazzjoni u persistenza ta' kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti. Għandha tkun ipprovduta ġustifikazzjoni għal għażla ta' teħid ta' kampjuni; il-kampjuni għal analiżi ġeneralment għandhom ikunu l-istess bħal dawk ta' hawn fuq (ara l-paragrafu 37).

▼M4

39. Il-kwantifikazzjoni tar-radjuattività għal studji dwar distribuzzjoni ta' tessuti tista' ssir billi jintużaw dissezzjoni ta' organi, omoġenizzazzjoni, kombustjoni u/jew solubilizzazzjoni, segwiti bl-għadd ta' xintillazzjonijiet likwidi (LSC) ta' residwi maqbudin. Ċerti tekniki, li bħalissa jinsabu f'diversi stadji ta' żvilupp, eż. awtoradjografija kwantitattiva tal-ġisem kollu u awtoradjografija reċettriċi mikroskopika jistgħu jkunu utli biex tkun iddeterminata d-distribuzzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'organi u/jew f'tessuti (3) (4).

40. Għal rotot ta' espożizzjoni minbarra orali, għandhom jinġabru tessuti speċifiċi u jkunu analizzati, bħal pulmuni fi studji ta' inalazzjoni u ġilda fi studji dermali. Ara l-paragrafi 74-78.

Metaboliżmu

41. Eskreta (u plażma, kif jixraq) għandhom jinġabru għal identifikazzjoni u kwantifikazzjoni ta' kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti mhux mibdulin kif deskritt fil-paragrafi 44-49. Il-ġabra flimkien tal-eskreta biex tkun iffaċilitata l-identifikazzjoni ta' metaboliti fi grupp ta' doża partikolari huwa aċċettabbli. It-teħid ta' profil ta' metaboliti minn kull perjodu ta' żmien huwa rrakkomandat. Iżda, jekk nuqqas ta' kampjun u/jew radjuattività ma jħallux li jsir dan, il-ġmigħ ta' awrina u rawt f'diversi punti ta' ħin ikun aċċettabbli iżda l-ġmigħ fir-rigward tas-sessi jew tad-doži kollha ma jkunx aċċettabbli. Għandhom jintużaw metodi kwalitattivi u kwantitattivi biex ikunu analizzati awrina, rawt, radjuattività skaduta minn annimali ttrattati, u bili jekk ikun xieraq.

42. Għandhom isiru sforzi raġonevoli biex ikunu identifikati l-metaboliti kollha li jkun hemm f'5 % jew aktar tad-doża amministrata u biex tkun ipprovduta skema metabolika għall-kimika għall-ittestjar. Għandhom ikunu identifikati kimiċi għall-ittestjar li kienu kkaratterizzati fl-eskreta bħala li jikkomprendu 5 % jew aktar tad-doża amministrata. Identifikazzjoni tirreferi għad-determinazzjoni strutturali eżatta ta' komponenti. B'mod tipiku, identifikazzjoni tinkiseb jew b'kokromatografija tal-metabolite bi standards magħrufin billi jintużaw żewġ sistemi mhux bħal xulxin jew b'tekniki b'kapaċità għal identifikazzjoni strutturali pożittiva bħal spettrometrija tal-massa, reżonanza nukleari manjetika (NMR), eċċ. Fil-każ ta' kokromatografija, tekniki kromatografiċi li jutilizzaw l-istess faži stazzjonarja b'żewġ sistemi differenti ta' solventi ma jitqisux li jkunu verifika adegwata ta' żewġ metodi ta' identità ta' metaboliti, minħabba li l-metodi ma jkunux indipendenti. Identifikazzjoni b'kokromatografija għandha tinkiseb billi jintużaw żewġ sistemi mhux bħal xulxin, analitikament indipendenti bħal kromatografija ta' saff irqiq ta' faži kuntrarja u normali (TLC) u kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja (HPLC). Sakemm is-separazzjoni kromatografika tkun ta' kwalità adattata, f'dak il-każ ma tkunx meħtieġa konferma addizzjonali b'mezzi spettroskopiċi. Alternattivament, identifikazzjoni mhux ambigwa tista' tinkiseb billi jintużaw metodi li jipprovdu informazzjoni strutturali bħal: kromatografija likwida/spettrometrija tal-massa (LC-MS), jew kromatografija likwida/spettrometrija tal-massa tandem (LC-MS/MS), kromatografija tal-gass/spettrometrija tal-massa (GC-MS), u spettrometrija NMR.

43. Jekk ma tkunx tista' ssir identifikazzjoni ta' metaboliti f'5 % jew aktar tad-doża amministrata, għandha tingħata ġustifikazzjoni/spjegazzjoni fir-rapport finali. Jista' jkun xieraq li jkunu identifikati metaboliti li jkunu jirrappreżentaw anqas minn 5 % tad-doża amministrata biex jinkiseb għarfien aħjar tal-passaġġ metaboliku għall-valutazzjoni tal-periklu u/jew tar-riskju tal-kimika għall-ittestjar. Għandha tingħata konferma strutturali kull meta jkun possibbli. Din tista' tinkludi teħid ta' profili fil-plażma jew fid-demm jew f'tessuti oħra.

▼M4

Eskrezzjoni

44. Ir-rata u l-kwantità ta' eskrezzjoni tad-doża amministrata għandhom ikunu ddeterminati billi jitkejjel il-perċentwali ta' doża rkuprata (radjuattiva) mill-awrina, mir-rawt u mill-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra. Din id-dejta tgħin ukoll biex ikun stabbilit bilanċ ta' massa. Il-kwantitajiet ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) eliminati fl-awrina, fir-rawt u fl-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra għandhom ikunu ddeterminati f'intervalli ta' ħin adatti (ara l-paragrafi 47-49). Esperimenti ta' doża ripetuta għandhom jitfasslu sewwa biex jitħalla jkun hemm ġbir ta' dejta ta' eskrezzjoni biex jitħarsu l-għanijiet deskritti fil-paragrafu 26. Dan jippermetti li jkun hemm paragun ma' esperimenti ta' doża waħda.

45. Jekk studju pilota jkun wera li ma jkun ħareġ bħala eskreta fl-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra ebda ammont sinifikanti ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) (skont il-paragrafu 49), f'dak il-każ l-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra ma jkunx jeħtiġilha tingħabar fl-istudju definittiv.

46. Kull annimal għandu jitqiegħed f'unità metabolika separata għall-ġbir ta' eskreta (awrina, rawt u arja ta' teħid tan-nifs 'il barra). Fit-tmiem ta' kull perjodu ta' ġbir (ara l-paragrafi 47-49), l-unitajiet metaboliċi għandhom jitlaħalħu b'solvent adattat (dan huwa magħruf bħala "ħasil tal-gaġġa") biex ikun żgurat irkupru massimu tal-kimika għall-ittestjar (radjuattività). Il-ġbir ta' eskreta għandu jintemm wara 7 ijiem, jew wara li mill-anqas 90 % tad-doża amministrata tkun ġiet irkuprata, skont liema minnhom jiġi l-ewwel.

47. Il-kwantitajiet totali ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) fl-awrina għandhom ikunu ddeterminati f'mill-anqas żewġ punti ta' ħin fl-ewwel jum tal-ġbir, li wieħed minnhom għandu jkun f'24 siegħa wara d-dożaġġ, u kuljum minn hemm 'il quddiem sakemm jintemm l-istudju. Ix-xewqa hija li l-għażla tkun ta' aktar minn żewġ punti ta' teħid ta' kampjuni fl-ewwel jum (eż. fis-6, fit-12 u fl-24 siegħa). Ir-riżultati ta' studji pilota għandhom ikunu analizzati għal informazzjoni dwar punti ta' ħin alternattivi jew addizzjonali biex isir il-ġbir. Għandu jkun ipprovdut motiv għal skedi ta' ġbir.

48. Il-kwantitajiet totali ta' kimika għall-ittestjar (radjuattività) f'rawt għandhom ikunu ddeterminati fuq bażi ta' kull jum li tibda fl-24 siegħa wara d-dożaġġ sakemm jintemm l-istudju, jekk studji pilota ma jissuġġerux punti ta' ħin alternattivi jew addizzjonali għal ġbir. Għandu jkun ipprovdut motiv għal skedi ta' ġbir alternattivi.

49. Il-ġbir ta' CO_2 skadut u ta' materjali volatili oħra jista' jitwaqqaf f'esperiment ta' studju partikolari meta anqas minn 1 % tad-doża amministrata tinstab fl-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra matul perjodu ta' ġbir ta' 24 siegħa.

Studji ta' Perkors ta' Żmien

Kinetika ta' Plażma/Demm

50. Il-fini ta' dawn l-istudji huwa li jinkisbu stimi ta' parametri bażiċi ta' TK [eż. nofs ħajja C_{max}, $T_{max,}$ ($t_{1/2}$), AUC] għall-kimika għall-ittestjar. Dawn l-istudji jistgħu jsiru b'doża waħda jew, x'aktarx, b'żewġ dożi jew aktar. Id-dożi għandhom ikunu stabbiliti skont kif ikunu ddeterminati min-natura tal-esperiment u/jew skont il-kwistjoni li tkun qed tiġi indirizzata. Tista' tkun meħtieġa dejta kinetika biex ikunu solvuti kwistjonijiet bħad-disponibbiltà bijoloġika tal-kimika għall-ittestjar u/jew biex ikun iċċarat l-effett ta' doża fuq ikklirjar (eż. biex ikun iċċarat jekk ikklirjar ikunx issaturat b'mod li jkun jiddependi minn doża).

51. Għal dawn l-istudji għandu jintuża mhux anqas minn erba' annimali ta' sess wieħed għal kull grupp ta' doża. Għandha tingħata ġustifikazzjoni għas-sess tal-annimali użat. Għandu jitqies l-użu taż-żewġ sessi (erba' rġiel u erba' nisa) jekk ikun hemm evidenza li ssostni differenzi sustanzjali fit-tossiċità b'rabta mas-sessi.

▼**M4**

52. Wara li tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar (b'tikketta radjoloġika), għandhom jinkisbu kampjuni tad-demm minn kull annimal f'punti adatti ta' ħin bl-użu ta' metodoloġija xierqa ta' teħid ta' kampjuni. Il-volum u l-għadd ta' kampjuni tad-demm li jistgħu jinkisbu minn kull annimal jistgħu jkunu llimitati minn effetti potenzjali ta' teħid ripetut ta' kampjuni fuq is-saħħa/il-fiżjoloġija u/jew fuq is-sensittività tal-metodu analitiku. Kampjuni għandhom ikunu analizzati għal kull annimal għalih waħdu. F'xi ċirkostanzi (eż. karatterizzazzjoni ta' metaboliti), jista' jkun meħtieġ li jingħemgħu kampjuni minn aktar minn annimal wieħed. Kampjuni miġmugħin għandhom ikunu identifikati b'mod ċar u għandha tingħata spjegazzjoni għall-ġabra flimkien. Jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika, analiżi tar-radjuattività totali li jkun hemm tista' tkun adegwata. Jekk ikun hekk, radjuattività totali għandha tkun analizzata fid-demm u fil-plażma kollha jew fil-plażma u fiċ-ċelluli ħomor tad-demm biex titħalla ssir kalkulazzjoni tal-proporzjon ta' demm/plażma. F'ċirkostanzi oħra jistgħu jkunu meħtieġa investigazzjonijiet aktar speċifiċi li jkunu jeħtieġu l-identifikazzjoni ta' kompost u/jew ta' metaboliti prinċipali, jew ikun meħtieġ li jkun ivvalutat it-tgħaqqid ta' proteini.

Tessuti Kinetiċi Oħra

53. L-għan ta' dawn l-istudji huwa li tinkiseb informazzjoni dwar il-perkors ta' żmien biex ikunu indirizzati affarijiet relatati ma' kwistjonijiet bħal modalità tossika ta' azzjoni, akkumulazzjoni bijoloġika u persistenza bijoloġika permezz ta' determinazzjoni ta' livelli ta' kimika għall-ittestjar f'diversi tessuti. L-għażla ta' tessuti u l-għadd ta' punti ta' ħin evalwati jkunu jiddependu mill-kwistjoni li jkollha tkun indirizzata u mid-database tossikoloġika għall-kimika għall-ittestjar. It-tifsila ta' dawn l-istudji addizzjonali ta' tessuti kinetiċi għandha tqis informazzjoni miġbura kif deskritt fil-paragrafi 37-40. Dawn l-istudji jistgħu jinvolvu dożaġġ wieħed jew ripetut. Għandu jkun ipprovdut motiv dettaljat għall-approċċ użat.

54. Raġunijiet biex isiru studji oħra dwar tessuti kinetiċi jistgħu jinkludu:

— Evidenza ta' nofs ħajja tad-demm estiża, li tindika li jista' jkun hemm akkumulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'diversi tessuti jew

— interess li wieħed jara jekk ikunx inkiseb livell ta' stat regolari f'tessuti speċifiċi (eż. fi studji dwar dożaġġ ripetut; ukoll jekk ikun jidher li nkiseb livell ta' demm fi stat regolari ta' kimika għall-ittestjar, jista' jkun hemm interess li jkun aċċertat li jkun intlaħaq livell ta' stat regolari f'tessuti mmirati).

55. Għal dawn it-tipi ta' studji dwar perkors ta' żmien, għandha tkun amministrata doża orali xierqa ta' kimika għall-ittestjar lil mhux anqas minn erba' annimali għal kull doża għal kull punt ta' ħin, u l-perkors ta' żmien ta' distribuzzjoni jkun immonitorjat f'tessuti magħżulin. Jista' jintuża sess wieħed biss, sakemm ma tkunx osservata tossiċità speċifika għall-ġeneru. Jekk ikunux analizzati radjuattività totali jew kimika u/jew metaboliti prinċipali jkun jiddependi wkoll mit-tessut li jkun qed jiġi eżaminat. Għandha ssir valutazzjoni ta' distribuzzjoni ta' tessuti bl-użu ta' tekniki adatti.

Induzzjoni/Inibizzjoni ta' Enzimi

56. Studji li jindirizzaw l-effetti li jista' jkun hemm ta' induzzjoni/inibizzjoni ta' enzimi jew ta' trasformazzjoni bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar li tkun qed tiġi studjata jistgħu jkunu meħtieġa f'każ wieħed jew aktar li ġejjin:

1. L-evidenza li jkun hemm tkun tindika relazzjoni bejn trasformazzjoni bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar u tossiċità msaħħa;

2. Id-dejta li jkun hemm dwar tossiċità tkun tindika relazzjoni mhux lineari bejn doża u metaboliżmu;

▼M4

3. Ir-riżultati ta' studji dwar identifikazzjoni ta' metaboliti juru identifikazzjoni ta' metabolite li tista' tkun tossika li setgħet kienet prodotta minn passaġġ ta' enzima miġjuba mill-kimika għall-ittestjar;

4. Fi spjegazzjoni ta' effetti li jkun ippostulat li jkollhom rabta ma' fenomini ta' induzzjoni ta' enzimi;

5. Jekk ikunu osservati tibdiliet tossikoloġiċi sinifikanti fil-profil metaboliku tal-kimika għall-ittestjar permezz ta' esperimenti in vitro jew in vivo fi speċijiet jew f'kundizzjonijiet differenti, tista' tkun meħtieġa karatterizzazzjoni tal-enzima/i involuta/i (eż. enzimi tal-Faži I bħal isoenzimi tas-sistema ta' ossiġenaži mono li jkunu jiddependu minn Ċitokromju P450, enzimi tal-Faži II bħal isoenzimi ta' sulfotransferaži jew glucuronosyl trasferimentaži ta' difosfat tal-uridina jew kull enzima rilevanti oħra). Din l-informazzjoni tista' tintuża biex tkun evalwata l-pertinenza ta' estrapolazzjonijiet minn speċi għal speċi.

57. Għandhom jintużaw protokolli xierqa ta' studji biex tkun evalwata kimika għall-ittestjar relatata ma' bidliet f'TK, ivvalidati u ġġustifikati bħala tajbin. Eżempji ta' tifsiliet ta' studji jikkonsistu f'dożaġġ ripetut b'kimika għall-ittestjar mingħajr tikketta, segwiti b'doża waħda b'tikketta radjoloġika fl-14-il jum, jew b'dożaġġ ripetut b'kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika u b'teħid ta' kampjuni fl-1, fis-7 u fl-14-il jum għal determinazzjoni ta' profili ta' metaboliti. Dożaġġ ripetut b'kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika jista' wkoll jipprovdi informazzjoni dwar akkumulazzjoni bijoloġika (ara l-paragrafu 26).

APPROĊĊI SUPPLIMENTARI

58. Approċċi supplimentari lil hinn mill-esperimenti in vivo deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar jistgħu jipprovdu informazzjoni utli dwar l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu jew l-eliminazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'ċerti speċijiet.

Użu ta' informazzjoni *in vitro*

59. Jistgħu jkunu indirizzati diversi mistoqsijiet dwar il-metaboliżmu tal-kimika għall-ittestjar fi studji *in vitro* billi jintużaw sistemi ta' ttestjar adatti. Jistgħu jintużaw epatoċiti li jkunu għadhom kif ġew iżolati jew li kienu f'kultura u frazzjonijiet subċellulari (eż. mikrożomi u ċitosoli jew frazzjoni S9) mill-fwied biex ikunu studjati metaboliti li jista' jkun hemm. Metaboliżmu lokali fl-organu mmirat, eż. il-pulmun, jista' jkun ta' interess għall-valutazzjoni tar-riskju. Għal dawn l-għanijiet, frazzjonijiet mikrosomali ta' tessuti mmirati jistgħu jkunu utli. Studji dwar mikrożomi jistgħu jkunu utli biex ikunu indirizzati differenzi potenzjali dwar ġeneru u stadji tal-ħajja u biex ikunu kkaratterizzati parametri ta' enzimi (K_m u V_{max}) li jistgħu jkunu ta' għajnuna fil-valutazzjoni ta' dipendenza fuq doża ta' metaboliżmu b'rabta ma' livell ta' konċentrazzjoni. Flimkien ma' dan, mikrożomi jistgħu jkunu utli biex ikunu identifikati l-enżimi mikrosomali speċifiċi involuti fil-metaboliżmu tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jkunu rilevanti f'estrapolazzjoni ta' speċijiet (ara wkoll il-paragrafu 56). Il-potenzjal għal induzzjoni ta' trasformazzjoni bijoloġika jista' wkoll ikun eżaminat billi jintużaw frazzjonijiet subċellulari tal-fwied (eż. mikrożomi u ċitosoli) tal-annimali ttrattati minn qabel bil-kimika għall-ittestjar ta' interess, *in vitro* permezz ta' studji dwar induzzjoni ta' epatoċite jew minn linji speċifiċi ta' ċelluli li jkunu jesprimu enzimi rilevanti. F'ċerti ċirkostanzi u f'kundizzjonijiet xierqa, frazzjonijiet subċellulari li jkunu ġejjin minn tessuti tal-bniedem jistgħu jitqiesu biex jintużaw biex ikunu ddeterminati differenzi li jista' jkun hemm ta' speċijiet fi trasformazzjoni bijoloġika. Ir-riżultati minn investigazzjonijiet *in vitro* jistgħu wkoll ikunu utli fl-iżvilupp ta' mudelli PBTK (5).

▼M4

60. Studji ta' assorbiment dermali *in vitro* jistgħu jipprovdu informazzjoni supplimentari biex ikun ikkaratterizzat assorbiment (6).

61. Kulturi ta' ċelluli primarji minn ċelluli tal-fwied u ftieti friski ta' tessuti jistgħu jintużaw biex ikunu indirizzati mistoqsijiet simili dwar mikrożomi tal-fwied. F'ċerti każijiet, jista' jkun possibbli jitwieġbu mistoqsijiet speċifiċi billi jintużaw linji ta' ċelluli b'espressjoni definita tal-enzima rilevanti jew b'linji ta' ċelluli maħdumin. F'certi każijiet, jista' jkun utli li jkunu studjati l-inibizzjoni u l-induzzjoni ta' isożimi speċifiċi ta' ċitokromju P450 (eż. CYP1A1, 2E1, 1A2 u oħrajn) u/jew enżimi tal-Fażi II mill-kompost prinċipali billi jintużaw studji *in vitro*. Informazzjoni miksuba tista' tkun utli għal komposti strutturati bl-istess mod.

Użu ta' Dejta Tossikokinetika minn Studji dwar Tossiċità bħala Informazzjoni Komplimentari

62. Analiżi ta' kampjuni ta' demm, tessuti u/jew eskreta miksubin meta jkun qed isir kull studju ieħor dwar tossiċità tista' tipprovdi dejta dwar disponibbiltà bijoloġika, bidliet f'konċentrazzjoni ta' plażma f'waqtha (AUC, C_{max}), potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika, rati ta' kklirjar u tibdiliet fil-ġeneru jew fi stadji tal-ħajja fil-metaboliżmu u fil-kinetika.

63. Konsiderazzjoni tat-tifsila tal-istudju tista' tintuża biex jitwieġbu mistoqsijiet relatati ma': saturazzjoni ta' assorbiment, trasformazzjoni bijoloġika jew passaġġi ta' eskrezzjoni f'livelli ta' dożi ogħla; it-tħaddim ta' passaġġi metaboliċi ġodda f'dożi ogħla u l-limitazzjoni ta' metaboliti tossiċi għal dożi ogħla.

64. Konsiderazzjonijiet oħra dwar valutazzjoni tal-periklu jistgħu jinkludu kwistjonijiet bħal:

— Sensittività relatata mal-età minħabba differenzi fl-istatus tal-limitu bejn demm u moħħ, kilwa u/jew kapaċitajiet ta' diżintossifikazzjoni;

— Sensittività ta' subpopolazzjoni minħabba differenzi f'kapaċitajiet ta' trasformazzjoni bijoloġika jew differenzi oħra ta' TK;

— Kemm tkun l-espożizzjoni tal-fetu minn trasferiment ta' kimiċi mill-plaċenta jew tal-wild ġdid mill-irdigħ.

Użu ta' Mudellar Tossikokinetiku

65. Mudelli tossikokinetiċi jistgħu jkunu utli għal diversi aspetti ta' valutazzjoni tal-periklu u tar-riskju bħal, pereżempju fit-tbassir ta' espożizzjoni sistemika u ta' doża għal tessuti interni. Barra dan, jistgħu jkunu indirizzati mistoqsijiet dwar modalità ta' azzjoni, u dawk il-mudelli jistgħu jipprovdu bażi għal estrapolazzjoni ma' speċijiet, rotot ta' espożizzjoni, xejriet ta' dożaġġ, u għal valutazzjoni tar-riskju għal bniedem. Dejta utli biex ikunu żviluppati mudelli ta' PBTK għal kimika għall-ittestjar f'kull speċi partikolari jinkludu 1) koeffiċjenti ta' partizzjoni, 2) kostanti ta' kimika bijoloġika u parametri fiżjoloġiċi, 3) parametri ta' assorbiment speċifiċi għal rotta u 4) dejta kineta *in vivo* għal evalwazzjoni ta' mudelli [eż. parametri ta' kklirjar għal passaġġi ta' eskrezzjoni (> 10 %), K_m u V_{max} għal metaboliżmu]. Id-dejta ta' esperimenti użata fi żvilupp ta' mudelli għandha tkun iġġenerata b'metodi xjentifikament tajbin, u r-riżultati tal-mudelli għandhom ikunu vvalidati. Parametri speċifiċi għal kimiċi u għal speċijiet bħal rati ta' assorbiment, partizzjoni ta' tessuti tad-demm u kostanti ta' rati metaboliċi sikwit ikunu ddeterminati biex jiffaċilitaw żvilupp ta' mudelli mhux kompartimentali jew mudelli b'bażi fiżjoloġika (7).

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

66. Huwa rrakkomandat li r-rapport tal-istudju jkun jinkludi werrej.

Korp tar-Rapport

67. Il-korp tar-rapport għandu jinkludi informazzjoni koperta minn dan il-Metodu ta' Ttestjar organizzata f'taqsimiet u paragrafi kif ġej:

Sommarju

68. Din it-taqsima tar-rapport tal-istudju għandha tinkludi sommarju tat-tifsila tal-istudju u deskrizzjoni ta' metodi użati. Għandha tagħti wkoll prominenza lis-sejbiet ewlenin dwar bilanċ ta' massa, in-natura u l-kobor tal-metaboliti, residwu ta' tessuti, rata ta' kklirjar, potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika, differenzi sesswali, eċċ. Is-sommarju għandu jkun ippreżentat b'dettalji suffiċjenti biex titħalla ssir evalwazzjoni tas-sejbiet.

Daħla

69. Din it-taqsima tar-rapport għandha tinkludi l-għanijiet tal-istudju, il-motiv u t-tifsila, kif ukoll referenzi adatti u informazzjoni storika bħala sfond.

Materjali u Metodi

70. Din it-taqsima tar-rapport għandha tinkludi deskrizzjonijiet dettaljati tal-informazzjoni kollha pertinenti, inklużi:

(a) Kimika għall-Ittestjar

Din is-subtaqsima għandha tinkludi identifikazzjoni tal-kimika għall-ittestjar: l-isem tal-kimika, l-istruttura molekulari, id-determinazzjoni kwalitattiva u kwantitattiva tal-kompożizzjoni kimika tagħha, il-purezza kimika u kull meta jkun possibbli, it-tip u l-kwantitajiet ta' kull impurezza. Għandha tinkludi wkoll informazzjoni dwar proprjetajiet fiżiċi/kimiċi, inkluż l-istat fiżiku, lewn, solubilità gross u/jew koeffiċjent tal-partizzjoni, stabbiltà, u fejn xieraq, korrużività. Jekk tkun applikabbli, għandha tingħata informazzjoni dwar isomeri. Jekk il-kimika għall-ittestjar tkun b'tikketta radjoloġika, f'din is-subtaqsima għandha tkun inkluża informazzjoni dwar dan li ġej: it-tip ta' radjonuklid, il-pożizzjoni tat-tikketta, attività speċifika u purezza radjukimika.

Għandhom ikunu ddikjarati t-tip jew id-deskrizzjoni ta' kull vejjikolu, dilwent, aġent ta' sospensjoni u emulsifikatur jew materjal ieħor użati biex tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar.

(b) Annimali tat-Test

Din is-subtaqsima għandha tinkludi informazzjoni dwar l-annimali tat-test, inklużi għażla u ġustifikazzjoni għal speċi, razza u età meta jibda l-istudju, sess, kif ukoll piż tal-ġisem, stat ta' saħħa u trobbija tal-annimali.

(c) Metodi

Din is-subtaqsima għandha tinkludi dettalji tat-tifsila tal-istudju u l-metodoloġija użata. Għandha tinkludi deskrizzjoni ta':

(1) Ġustifikazzjoni għal kull modifika ta' rotta ta' espożizzjoni u kundizzjonijiet ta' espożizzjoni, jekk applikabbli;

▼M4

(2) Ġustifikazzjoni għal għażla ta' livelli ta' doża;

(3) Deskrizzjoni ta' studji pilota użati fit-tifsila sperimentali tal-istudji ta' segwitu, jekk applikabbli. Għandha tkun sottomessa dejta ta' sostenn tal-istudju pilota;

(4) Kif tkun tħejjiet is-soluzzjoni tad-dożaġġ u t-tip ta' solvent jew vejjikolu użat, jekk ikun hemm;

(5) Għadd ta' gruppi ta' trattament u għadd ta' annimali għal kull grupp;

(6) Livelli ta' dożaġġ u volum (u attività speċifika tad-doża meta tintuża r-radjuattività);

(7) Rotta/rotot u metodi ta' amministrazzjoni;

(8) Frekwenza ta' dożaġġ;

(9) Perjodu ta' sawm (jekk użat);

(10) Radjuattività totali għal kull annimal;

(11) Maniġġar tal-annimali;

(12) Ġbir u maniġġar ta' kampjuni;

(13) Metodi analitiċi użati għal separazzjoni, kwantifikazzjoni u identifikazzjoni ta' metaboliti;

(14) Limitu ta' detezzjoni għall-metodi użati;

(15) Il-kejlijiet u proċeduri sperimentali oħra użati (inkluża validazzjoni ta' metodi għal analiżi ta' metaboliti).

(d) Analiżi ta' Statistika

Jekk tintuża analiżi ta' statistika biex ikunu analizzati s-sejbiet tal-istudju, f'dak il-każ għandha tkun inkluża informazzjoni suffiċjenti dwar il-metodu ta' analiżi u l-programm tal-kompjuter użat, biex reviżur/statistiku indipendenti jkun jista' jevalwa mill-ġdid u jibni mill-ġdid l-analiżi.

Fil-każ ta' studji ta' mudellar ta' sistemi bħal PBTK, il-preżentazzjoni ta' mudelli għandha tinkludi deskrizzjoni sħiħa tal-mudell biex jitħallew isiru rikostruzzjoni u validazzjoni indipendenti tal-mudell (ara l-paragrafu 65 u l-Appendiċi: Definizzjonijiet).

Riżultati

71. Id-dejta kollha għandha tinġabar fil-qosor u tiġi ttabulata b'evalwazzjoni xierqa ta' statistika u deskritta fit-test ta' din it-taqsima. Dejta ta' radjuattività magħduda għandha tinġabar fil-qosor u tkun ippreżentata kif jixraq għall-istudju, tipikament bħala ekwivalenti ta' mikrogrammi jew milligrammi għal kull massa ta' kampjun, għalkemm ikunu jistgħu jintużaw unitajiet oħra. Din it-taqsima għandha tinkludi illustrazzjonijiet grafiċi tas-sejbiet, riproduzzjoni ta' dejta kromatografika u spettrometrika rappreżentattiva, identifikazzjoni ta' metaboliti/kwantifikazzjoni u passaġġi metaboliċi proposti, inkluża struttura molekulari ta' metaboliti. Flimkien ma' dan, f'din it-taqsima għandha tkun inkluża l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun tapplika:

(1) Kwantità u perċentwali ta' rkupru ta' radjuattività fl-awrina, rawt, arja ta' teħid tan-nifs 'il barra, u ħasil tal-gaġeġ mill-awrina u r-rawt.

— Għal studji dermali, inkludi wkoll dejta dwar irkupru ta' kimika għall-ittestjar minn ġilda ttrattata, minn ħasil ta' ġlud u minn radjuattività residwali fl-apparat li jgħatti l-ġilda u mill-unità metabolika, u inkludi wkoll riżultati tal-istudju dwar ħasil dermali. Għal aktar diskussjoni, ara l-paragrafi 74-77.

▼M4

— Għal studji ta' inalazzjoni, inkludi wkoll dejta dwar irkupru ta' kimika għall-ittestjar minn pulmuni u tessuti nażali (8). Għal aktar diskussjoni, ara l-paragrafu 78.

(2) Id-distribuzzjoni ta' tessuti tkun irrappurtata bħala perċentwali tad-doża amministrata u tal-konċentrazzjoni (ekwivalenti ta' mikrogrammi għal kull gramma ta' tessuti), u proporzjonijiet ta' tessut ma' demm u ta' tessut ma' plażma;

(3) Bilanċ ta' materjali żviluppat minn kull studju li jinvolvi l-analiżi ta' tessuti tal-ġisem u eskreta;

(4) Konċentrazzjonijiet ta' plażma u parametri tossikokinetiċi (disponibbiltà bijoloġika, AUC, Cmax, Tmax, ikklirjar, nofs ħajja) wara amministrazzjoni mir-rotta/rotot rilevanti ta' espożizzjoni;

(5) Rata u ammont ta' assorbiment tal-kimika għall-ittestjar wara amministrazzjoni mir-rotta/rotot ta' espożizzjoni;

(6) Kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti (irrapportati bħala perċentwali tad-doża amministrata) miġburin fl-eskreta;

(7) Referenza għal dejta fl-appendiċi li jkun fiha dejta dwar annimali individwalment għall-punti kollha ta' tmiem ta' kejlijiet (eż. amministrazzjoni ta' doża, rkupru ta' perċentwali, konċentrazzjonijiet, parametri ta' TK, eċċ);

(8) Figura bil-passaġġi metaboliċi proposti u l-istrutturi molekulari tal-metaboliti.

Diskussjoni u Konlużjonijiet

72. F'din it-taqsima l-awtur għandu:

(1) Jipprovdi passaġġ metaboliku propost ibbażat fuq ir-riżultati tal-metaboliżmu u fuq id-dispożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

(2) Jiddiskuti kull speċi u differenzi sesswali potenzjali dwar id-dispożizzjoni u/jew trasformazzjoni bijoloġika tal-kimika għall-ittestjar;

(3) Jittabula u jiddiskuti l-identifikazzjoni u l-kobor tal-metaboliti, ir-rati ta' kklirjar, il-potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika u l-livell ta' residwi ta' tessuti ta' ġenitur u/jew metabolite/i), kif ukoll bidliet, jekk ikun hemm, dipendenti minn doża f'parametri ta' TK, kif ikun jixraq;

(4) Jintegra f'din it-taqsima kull dejta ta' TK rilevanti miksuba waqt li kienu qed isiru studji dwar tossiċità;

(5) Jipprovdi konklużjoni qasira li s-sejbiet tal-istudju jkunu jistgħu jsostnuha;

(6) Iżid it-Taqsimiet (skont il-ħtieġa jew kif ikun jixraq).

73. Taqsimiet addizzjonali għandhom jintużaw biex tiddaħħal informazzjoni bibliografika ta' sostenn, tabelli, figuri, appendiċijiet, eċċ.

▼M4

ROTOT ALTERNATTIVI TA’ ESPOŻIZZJONI

Dermali

Trattament Dermali

74. Din it-taqsima tipprovdi informazzjoni speċifika dwar investigazzjoni tas-tossikokinetika tal-kimika għall-ittestjar bir-rotta dermali. Għall-assorbiment dermal, għandu jiġi kkonsutat l-kapitolu B.44 ta’ dan l-Anness [Assorbiment tal-ġilda: il-metodu *in vivo* (9)]. Għal punti ta’ tmiem oħra bħal distribuzzjoni u metaboliżmu, jista’ jintuża dan il-Metodu ta’ Ttestjar B.36. Għandu jintuża livell wieħed jew aktar ta’ doża għall-kimika għall-ittestjar fit-trattament dermali. Il-kimika għall-ittestjar (eż. pura, dilwita jew materjal ifformulat li jkun fih il-kimika għall-ittestjar li tkun applikata fuq il-ġilda) għandha tkun l-istess (jew sostitut realistiku) bħal dik li għaliha l-bnedmin jew speċi potenzjali oħra mmirata jistgħu jkunu esposti. Il-livell ta’ doża għandu jintgħażel skont il-paragrafi 20-26 ta’ dan il-Metodu ta’ Ttestjar. Fatturi li jistgħu jitqiesu għal għażla ta’ doża dermali jinkludu espożizzjoni mistennija mill-bniedem u/jew dożi li fihom tkun ġiet osservata tossiċità fi studji oħra dermali dwar tossiċità. Id-doża dermali għandha tinħall, jekk ikun meħtieġ, f’vejjikolu adattat u tkun applikata f’volum adegwat biex iwassal id-doża. Ftit qabel l-ittestjar, il-pil għandu jitqasqas mill-erja dorsali tat-tronk tal-annimali tat-test. Jista’ jintuża t-taqxir, iżda dan għandu jsir madwar 24 siegħa qabel it-test. Meta l-pil ikun qed jitqasqas jew jitqaxxar, wieħed għandu joqgħod attent biex jevita li jisloħ il-ġilda, ħaġa li tista’ tibdel l-permeabbiltà tagħha. Madwar 10 % tal-wiċċ tal-ġisem għandu jitneħħielu kollox minn fuqu biex tkun applikata l-kimika għall-ittestjar. Għal kimiċi tossiċi ħafna, l-erja tal-wiċċ koperta tista’ tkun anqas minn madwar 10 %, iżda kemm jista’ jkun ħafna mill-erja għandha tkun koperta b’rita rqiqa u uniformi. L-istess erja tal-wiċċ tat-trattament għandha tintuża għall-gruppi tat-testijiet dermali kollha. L-erjas li tkun ingħatathilhom doża għandhom jitħarsu b’kopertura adattata li tinżamm ferma f’postha. L-annimali għandhom jitqiegħdu f’posthom individwalment.

75. Għandu jsir studju dwar ħasil dermali biex ikun ivvalutat l-ammont tad-doża applikata tal-kimika għall-ittestjar li jkun jista’ jitneħħa mill-ġilda billi l-erja tal-ġilda ttrattata tinħasel b’sapun ħafif u ilma. Dan l-istudju jista’ jgħin ukoll biex ikun stabbilit bilanċ ta’ massa meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata bir-rotta dermali. Għal dan l-istudju ta’ ħasil dermali għandha tkun applikata doża waħda tal-kimika għall-ittestjar lil żewġ annimali. L-għażla tal-livell tad-doża jkun skont il-paragrafu 23 ta’ dan il-Metodu ta’ Ttestjar (ara wkoll il-paragrafu 76 għal diskussjoni dwar ħin ta’ kuntatt mal-ġilda). L-ammonti ta’ kimika għall-ittestjar irkuprati waqt il-ħasil għandhom ikunu ddeterminati biex tkun ivvalutata l-effikaċja tat-tneħħija tal-kimika għall-ittestjar bil-proċedura tal-ħasil.

76. Sakemm ma tkunx tista’ ssir minħabba l-possibbiltà ta’ korrużjoni, il-kimika għall-ittestjar għandha tkun applikata u tinżamm fuq il-ġilda għal minimu ta’ 6 sigħat. Meta tkun ser titneħħa l-kopertura, l-erja ttrattata għandha tinħasel skont il-proċedura li l-profil tagħha jinsab fl-istudju dwar il-ħasil dermali (ara l-paragrafu 75). Kemm il-kopertura kif ukoll il-ħasil għandhom ikunu analizzati għall-kimika għall-ittestjar residwali. Meta jintemmu l-istudji, kull annimal għandu jinqatel b’mod uman skont (2), u l-ġilda ttrattata titneħħa. Parti adattata mill-ġilda ttrattata għandha tkun analizzata biex tkun iddeterminata l-kimika għall-ittestjar residwali (radjuattività).

77. Għall-valutazzjoni tossikokinetika ta’ farmaċewtiċi jistgħu jkunu meħtieġa proċeduri different, skont is-sistema regolatorja xierqa.

▼M4

Inalazzjoni

78. Għandha tintuża konċentrazzjoni waħda (jew aktar jekk ikun meħtieġ) ta' kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni għandha tintgħażel skont il-paragrafi 20-26 ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar. Trattamenti ta' inalazzjoni għandhom isiru billi jintuża apparat għal "kon tal-imnieħer" jew għal "ras biss" biex ma jitħalliex ikun hemm assorbiment minn rotot ta' espożizzjoni alternati (8). Jekk jintużaw kundizzjonijiet oħra ta' espożizzjoni ta' inalazzjoni, il-ġustifikazzjoni għall-modifika għandha tkun iddokumentata. Id-durata ta' espożizzjoni b'inalazzjoni għandha tkun iddefinita; espożizzjoni tipika ddum bejn 4 u 6 sigħat.

LETTERATURA:

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Il-Kapitolu B.45 ta' dan l-Anness: Assorbiment mill-Ġilda: Metodu In Vitro.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Il-Kapitolu B.44 ta' dan l-Anness: Assorbiment mill-Ġilda: Metodu In Vivo.

(10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Assorbiment: Proċess(i) ta' użu ta' kimiċi fi u madwar it-tessuti. Assorbiment jirreferi għall-kompost prinċipali u l-metaboliti kollha tiegħu. Ma għandux ikun konfuż ma' "disponibbiltà bijoloġika".

Akkumulazzjoni (Akkumulazzjoni bijoloġika): Żieda fl-ammont ta' kimika għall-ittestjar tul iż-żmien f'tessuti (is-soltu tessuti xaħmin, wara espożizzjoni ripetuta); jekk it-teħid ta' kimika għall-ittestjar fil-ġisem ikun akbar mir-rata li biha titneħħa, l-organiżmu jakkumula l-kimika għall-ittestjar u jistgħu jseħħu konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar. Akkumulazzjoni bijoloġika:

ADME: Akronimu għal 'Assorbiment, Distribuzzjoni, Metaboliżmu, u Eskreta'.

AUC: (Erja taħt il-kurva tal-plażma ta' konċentrazzjoni-ħin): Erja taħt il-kurva f'parti ta' konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fil-plażma tul iż-żmien. Tirrappreżenta l-ammont totali ta' kimika għall-ittestjar assorbit mill-ġisem f'perjodu predeterminat ta' żmien. F'kundizzjonijiet lineari, l-AUC (minn ħin żero sal-infinità) tkun proporzjonali għall-ammont totali ta' kimika għall-ittestjar assorbita mill-ġisem, irrispettivament mir-rata ta' assorbiment.

Awtoradjografija: (Awtoradjografija tal-ġisem kollu): Użata biex ikun iddeterminat b'mod kwalitattiv u/jew kwantitattiv fejn ikunu jinsabu tessuti ta' kimika għall-ittestjar radjuattiva, din it-teknika tuża film ta' raġġi-X jew aktar reċenti immaġnijiet fosforizzati diġitali biex tagħmel jidhru molekuli jew bċejjeċ ta' molekuli b'tikketta radjuattiva billi tirreġistra r-radjazzjoni maħruġa fl-oġġett studjat. Awtoradjografija kwantitattiva tal-ġisem kollu, mqabbla ma' dissezzjoni ta' organi, jista' jkollha xi vantaġġi għall-evalwazzjoni tad-distribuzzjoni ta' kimika għall-ittestjar u għall-valutazzjoni ta' rkupru globali u r-riżoluzzjoni ta' materjali radjuattivi f'tessuti. Vantaġġ wieħed sinifikanti, pereżempju, huwa li tista' tintuża f'mudell ta' annimal bix-xagħar biex ikun ivvalutat jekk jistax ikun hemm assoċjazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ma' melanin, li jista' jgħaqqad ċerti molekuli. Iżda, filwaqt li tista' tipprovdi b'mod konvenjenti prospetti tal-ġisem kollu tas-siti ta' tgħaqqid ta' kapaċità għolja u affinità baxxa, din it-teknika tista' tkun limitata biex jintgħarrfu siti mmirati speċifiċi bħal siti li jgħaqqdu reċetturi fejn ikunu meħtieġa relattivament riżoluzzjoni għolja u sensittività għolja għal detezzjoni. Meta tintuża awtoradjografija, esperimenti maħsubin biex jiddeterminaw bilanċ ta' massa ta' kompost amministrat għandhom isiru bħala grupp separat jew fi studju separat mill-esperiment ta' distribuzzjoni ta' tessuti, fejn l-eskreta kollha (li tista' tinkludi wkoll arja meħuda 'l barra man-nifs) u karkassi sħaħ ikunu omoġenizzati u analizzati billi jingħaddu b'xintillazzjoni likwida.

Eskrazzjoni ta' bili: Eskrezzjoni mill-kanal tal-bili

Akkumulazzjoni bijoloġika: Ara "Akkumulazzjoni".

Disponibbiltà bijoloġika: Frazzjoni ta' doża amministrata li tilħaq iċ-ċirkolazzjoni sistemika jew li tkun disponibbli fis-sit ta' attività fiżjoloġika. Normalment, disponibbiltà bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar tirreferi għall-kompost prinċipali, iżda tista' tirreferi għall-metabolite tagħha. Tqis biss forma waħda ta' kimika. *Nota Bene:* disponibbiltà bijoloġika u assorbiment mhumiex l-istess. Jista' jkun hemm differenza bejn eż. assorbiment orali (jiġifieri preżenza fil-ħajt tal-musrana u fiċ-ċirkolazzjoni portali) u disponibbiltà bijoloġika (jiġifieri preżenza f'demm sistemiku u f'tessuti) minn degradazzjoni kimika minħabba metaboliżmu fil-ħajt tal-musrana jew trasport ta' effluss lura għal-lumen intestinali jew metaboliżmu presistemiku fil-fwied, fost fatturi oħra (10). Disponibbiltà bijoloġika tal-komponent tossiku (kompost prinċipali jew metabolite) hija parametru kritiku fil-valutazzjoni tar-rikju għall-bniedem (estrapolazzjoni ta' doża minn għoli għal baxx, estrapolazzjoni minn rotta għal rotta) għal derivazzjoni ta' valur intern minn NOAEL jew BDM esterni (doża applikata). Għal effetti tal-fwied fuq amministrazzjoni orali, huwa l-assorbiment orali li jkun biżżejjed. Iżda għal kull effett minbarra fil-portal ta' dħul, hija d-disponibbiltà bijoloġika li b'mod ġenerali tkun parametru aktar affidabbli għal użu ulterjuri fil-valutazzjoni tar-riskju, mhux l-assorbiment.

▼M4

Bijopersistenza: Ara "Persistenza".

Bijotrasformazzjoni: Konverżjoni kimika (Normalment enżematika) ta' kimika għall-ittestjar ta' interess f'kimika differenti fil-ġisem. Sinonima ma' "metaboliżmu".

C_{max}: Konċentrazzjoni massima (quċċata) ta' demm (plażma/serum) wara l-amminsitrazzjoni jew eskreta massima (quċċata) (f'urina jew rawt) wara l-amministrazzjoni.

Rata ta' kklirjar: Miżura kwantitattiva tar-rata li fiha kimika għall-ittestjar titneħħa mid-demm, plażma jew ċerta tessut f'kull unità ta' ħin.

Kompartament: Parti strutturali jew bijokemikali (jew unità) ta' ġisem, tessut jew ċellola, li hija separata mill-bqija.

Mogħdiji ta' dissotifikazzjoni: Serje ta' passi li jwasslu għall-eliminazzjoni ta' kimiċi tossiċi mill-ġisem, permezz ta' bidla metabolika jew eskrezzjoni.

Distribuzzjoni: Tixrid ta' kimika għall-ittestjar u d-derivattivi tagħha fl-organiżmu kollu.

Enzimi/Isożimi: Proteini li jikkatalizzaw ir-reazzjonijiet kimiċi. Isożimi huma enzimi li jikkatalizzaw reazzjonijiet kimiċi simili iżda huma differenti fis-sekwenza tal-aċidi amino tagħhom.

Parametri enzimatiċi: K_m: Kostant ta' Michaelis u V_{max}: veloċità massima.

Eskrezzjoni: Proċess(i) li permezz tagħhom titneħħa kimika għall-ittestjar jew il-metaboliti tagħha mill-ġisem.

B'mod esoġenu: Introdotti minn jew prodotti barra mill-organiżmu jew mis-sistema.

Estrapolazzjoni: Inferenza ta' valur wieħed jew iktar mhux magħrufin abbażi ta' dak li huwa magħruf jew ġie osservat.

Nofs ħajja ($t_{1/2}$): Il-ħin neċessarju għall-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar biex tonqos bin-nofs f'kompartament. Din tipikament tirreferi għall-konċentrazzjoni tal-plażma jew l-ammont ta' kimika għall-ittestjar fil-ġisem kollu.

Induzzjoni/Induzzjoni ta' enzimi: Sinteżi tal-enzimi bħala rispons għal stimulu ambjentali jew molekula li tinduċi.

Linearità/kinetiċi lineari: Proċess huwa lineari fit-termini tal-kinetiċi meta r-rati kollha ta' trasferiment bejn il-kompartamenti huma proporzjonati għall-ammonti jew il-konċentrazzjonijiet preżenti, jiġifieri l-ewwel ordni. Konsekwentement, il-volumi tal-ikklirjar u d-distribuzzjoni huma kostanti, kif ukoll in-nofs ħajjiet. Il-konċentrazzjonijiet miksuba huma proporzjonati għar-rata ta' dożaġġ (espożizzjoni), u l-akkumulazzjoni hija titbassar iżjed faċilment. Il-linearità/non linearità tista' tiġi vvalutata billi jiġu mqabbla l-paramteri rilevanti, eż. AUC, wara dozi differenti jew wara espożizzjoni unika u ripetuta. Nuqqas ta' dipendenza fuq id-doża jista' jkun indikattiv ta' saturazzjoni tal-enzimi involuti fil-metaboliżmu tal-kompost, żieda fl-AUC wara espożizzjoni ripetuta meta mqabbla ma ' espożizzjoni unika tista' tkun indikattiva għall-inibizzjoni tal-metaboliżmu u nuqqas fl-AUC jista' jkun indikattiv li qed jinduċi l-metaboliżmu [ara wkoll (11)].

▼M4

Bilanċ tal-massa: Kontabbiltà tal-kimika għall-ittestjar li tkun dieħla u ħierġa mis-sistema.

Bilanċ tal-materjal: Ara "bilanċ tal-massa".

Mekkaniżmu (Mod) ta' tossiċità/Mekkaniżmu (Mod) ta' azzjoni: Mekkaniżmu ta' azzjoni jirreferi għal interazzjonijiet bijokimiċi speċifiċi li fihom kimika għall-ittestjar tipproduċi l-effetti tagħha. Mod ta' azzjoni jirreferi għal mogħdiji iktar ġenerali li jwasslu għat-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar.

Metaboliżmu: Sinonima ma' "bijotrasformazzjoni".

Metaboliti: Prodotti ta' metaboliżmu jew proċessi metaboliċi.

Assorbiment Orali: Il-perċentwal tad-doża tal-kimika għall-ittestjar assorbita mis-sit tal-amminsitrazzjoni (jiġifieri sistema tal-GI). Dan il-paramteru kritiku jista' jintuża biex wieħed jifhem il-frazzjoni tal-kimika għall-ittestjar amministrata li tasal sal-vina portali, u sussegwentament il-fwied.

Koeffiċjent tal-parti: Magħruf ukoll bħala l-koeffiċjent tad-distribuzzjoni, huwa kejl tas-solubilità differenzjali ta' kimika f'żewġ solventi.

Livelli tal-quċċata tad-demm (plażma/serum): Konċentrazzjoni massima (quċċata) tad-demm (plażma/serum)wara l-amminstrazzjoni (ara wkoll "C_{max}").

Persistenza (persistenza bijoloġika): Preżenza fit-tul ta' kimika (f'sistema bijoloġika) minħabba reżistenza għal degradazzjoni/eliminazzjoni.

Aqra min-naħa għall-oħra: L-informazzjoni dwar il-punt tat-tmiem għal kimika waħda jew aktar tintuża biex isir tbassir tal-punt tat-tmiem għall-kimika mmirata.

Awtoradjografija Mikroskopika tar-Riċevitur (jew Mikroawtoradjografija tar-Riċevitur): Din it-teknika tista' tintuża biex tiskopri l-interazzjoni żenobijotika ma' siti tat-tessut speċifiċi jew popolazzjonijiet ta' ċelloli bħal pereżempju fl-irbit tar-riċevituri jew mod speċifiku ta' studji ta' azzjoni li jistgħu jirrikjedu riżoluzzjoni għolja u sensittività għolja li tista' ma tkunx fattibbli ma' tekniki oħra bħall-awtoradjografija tal-ġisem kollu.

Rotta ta' amministrazzjoni (orali, IV, dermali, inalazzjoni, eċċ.): Tirreferi għall-mezzi li bihom kimiċi jkunu amministrati lill-ġisem (eż. mill-ħalq b'gavage, mill-ħalq b'dieta, mill-ġilda, man-nifs 'il ġewwa, mill-vina, eċċ).

Saturazzjoni: Stat li bih wieħed jew aktar mill-proċessi kinetiċi (eż. assorbiment, metaboliżmu jew ikklirjar) ikunu f'massimu (jiġifieri 'saturati').

Sensittività: Kapaċità ta' metodu jew ta' strument li jiddistingwi bejn risponsi ta' kejl li jirrappreżentaw livelli differenti ta' interess varjabbli.

Livelli ta' stat stabbli tad-demm (plażma): L-istat mhux ekwilibrat ta' sistema miftuħa li fiha l-forzi kollha li jaġixxu fuq is-sistema huma eżattament kontrobilanċjati minn forzi ta' oppożizzjoni, f'tali manjiera li l-komponenti kollha tagħha huma stazzjonarji fil-konċentrazzjoni għalkemm fis-sistema hemm fluss ta' materjal.

Mudellar ta' Sistemi (Tossikokinetiċi bbażati fuq il-Fiżjoloġija, ibbażati fuq il-Farmakokinetika, Farmakokinetiċi bbażati fuq il-Fiżjoloġija, ibbażati fuq il-Bijoloġija, eċċ.): Mudell astratt li juża lingwa matematika biex jiddeskrivi l-aġir tas-sistema.

Tessut immirat: Tessut li fih ikun jidher effett prinċipali avvers ta' sustanza tossika.

▼M4

Kimika għall-ittestjar: Kwalunkwe kimika jew taħlita ttestjati bl-użu ta' dan il-Metodu għall-Ittestjar.

Distribuzzjoni tat-Tessuti: Ċaqliq riversibbli ta' kimika għall-ittestajr minn post fil-ġisem għall-post ieħor. Id-distribuzzjoni tat-tessut tista' tiġi studjata mid-dissezzjoni ta' organu, l-omoġenizzazzjoni, il-kombustjoni u l-għadd ta' xintillazzjonijiet likwidi jew permezz ta' awtoradjografija kwalitattiva u/jew kwantitattiva tal-ġisem kollu. Tal-ewwel hija utli biex jinkisbu l-konċentrazzjoni u l-perċentwali ta' rkupru minn tessuti u mill-karakss li jifdal tal-istess annimali, iżda tista' ma jkolliex riżoluzzjoni għat-tessuti kollha u tista' jkollha rkupru kumplessiv li huwa inqas mill-ideal (< 90 %). Ara d-definizzjoni għal tal-aħħar hawn fuq.

T_{max}: Ħin biex jintlaħaq C_{max}.

Tossikokinetiċi (Farmakokinetiċi): Studju tal-assorbiment, distribuzzjoni, metaboliżmu, eskrezzjoni ta' kimiċi tul iż-żmien.

Validazzjoni tal-mudelli: Proċess ta' valutazzjoni tal-adegwatezza ta' mudell biex jiddeskrivi b'mod konsistenti d-dejta disponibbli dwar it-tossikokinetika. Mudelli jistgħu jkunu vvalutati permezz ta' paragun ta' statistika u viżiv ta' tbasssir ta' mudelli b'valuri sperimentali ma' varjabbli komuni indipendenti (eż. ħin). Kemm tkun l-evalwazzjoni għandu jkun iġġustifikat b'rabta mal-użu maħsub tal-mudell.

▼B

B.37. **ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIĊITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* WARA L-ESPOŻIZZJONI AKUTA**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni ta' l-effetti tossiċi tas-sustanzi, huwa importanti li jiġi ikkonsidrat il-potenzjal ta' ċerti klassijiet ta' sustanzi biex jikkawża tipi speċifiċi ta' newrotossiċità li jistgħu ma jidrux fi studji tossiċi oħra. Ċerti sustanzi *organophosphorus* jidru li jikkawżaw dewmien tan-newrotossiċità u għandhom jitqisu kandidati għall-evalwazzjoni.

Testijiet ta' *screening in vitro* jistgħu jitħaddmu biex jiddentifikaw dawk is-sustanzi, jistgħu jikkawżaw dewmien fil-*polyneuropathy*; madankollu, sejbiet negattivi fl-istudji *in vitro* ma jipprovdux evidenza li s-sustanza tat-test mhiex *newrotossikant.*

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sustanzi *organophosphorus* jinkludu l- *organophosphorus esters, it-thioesters uncharged* jew *l-anhydrides* ta' l-aċdi *organophosphoric, organophosphonic* jew *organophosphoramidic* jew ta' l-aċdi *phosphorothioic, phosphonothioic* jew *phosphorothioamidic relatati*, jew sustanzi oħra li jistgħu jikkawżaw dewmien ta' newrotossiċità li xi drabi tidher f'din il-klassi ta' sustanzi.

Id-dewmien tan-newrotossiċità huwa sindromu assoċjat ma' *l-onset* tad-dewmien prolungat ta' l-*ataxia, id-distal axonopathies* fil-korda spinali u n-nerv periferali, u l-inibizzjoni u x-xjuħija tan-*neuropathy target esterase (NTE)* fit-tessut newrali.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanza ta' referenza tista' tiġi ttestjata bi grupp ta' kontroll pożittiv li juri li taħt il-kundizzjonijiet tat-test tal-laboratorju, ir-rispons ta' l-ispeċi ittestjati ma nbidilx b'mod sinifikanti.

Eżempju ta' newrotossikant użat f'irxa wisgħa huwa il-fosfat *tri–o–tolyl phosphate (Cas 78-30-8, Einecs 201-103-5, Cas* nomenkaltura: l-aċdu fosforiku, *tris(2–methylphenyl)ester),* magħruf ukoll bħala *tris–o–cresylphosphate.*

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test tiġi somministrata oralment lit-tiġieġ domestiku f'doża waħda. Meta huwa xieraq, it-tiġieġ huwa mħares mill-effetti *cholinergic* akuti. L-annimali jiġu osservati għal 21 jum għal imġieba anormali, *ataxia* u paraliżi.. Il-kejl bijokemikali, b'mod partikolari l-inibizzjoni tan-*neuropathy target esterase (NTE),* isir fuq it-tiġieġ li jingħażel bl-addoċċ minn kull grupp. Dan normalment isir 24 u 48 siegħa wara d-dożaġġ.Wieħed u għoxrin jum wara l-espożizzjoni l-bqija tat-tiġieġ jiġi maqtul u ssir l-eżaminazzjoni ħispatoloġika ta' tessuti newrali magħżula.

▼B

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.5.1. **Tħejjija**

Tiġieġ b'saħħtu u adult żagħżugħ li huwa ħieles minn mard virali u l-medikazzjoni li jfixxklu u li m'għandux anormalitajiet fil-mixja għandu jingħażel bl-adoċċ u assenjati għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament.Għandu wkoll jadatta għall kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 jiem qabel il-bidu ta' l-istudju.

Gaġeġ jew spazji magħluqa li huma kbar biżżejjed biex jippermettu ċ-ċaqliq ħieles tat-tiġieġ, u għandu jkun faċli biex tiġi osservata l-mixja tiegħu.

Id-dożaġġ bis-sustanza tat-test għandha normalment tingħata oralment bl-għalf li jingħata bilfors, kapsuli tal-ġelatina, jew metodu li jitqabbel magħhom. Il-likwidi jistgħu jingħataw mhux imħallta bl-ilma jew maħlula f'mezz xieraq bħal ma huwa ż-żejt tal-qamħ; jekk hu possibbli s-solidi għandhom jinħallu la darba dożi kbar tas-solidi fil-kapsuli tal-ġelatina jistgħu ma jiġux assorbiti sew. Għall-mezzi li mhumiex akwei il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa, u jekk le għandhom jiġu determinati qabel it-test.

1.5.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.5.2.1. *Annimali għat test*

It-tiġieġ żagħżugħ adult domestiku u li jbid (*Gallus gallus domesticus*), li għandu minn 8 sa 12-il xahar huwa rakkomandat. Għandhom jintużaw daqsijiet u razez standard. Normalment it-tiġieġ għandu jitrabba f'kundizzjonijiet li jippermettu ċ-ċaqliq ħieles.

1.5.2.2. *In-numru u s-sess*

Barra l-grupp tat-trattament, għandhom jintużaw kemm il-grupp ta' mezz ta' control u kemm dak ta' kontroll pożittiv. Il-grupp tal-mezz ta' kontroll għandu jiġi trattat bl-istess mod tal-grupp għat-trattament, ħlief li s-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test titneħħa.

Għandu jintużaw numru biżżejjed ta' tiġieġ f'kull grupp ta' għasafar sabiex mill-inqas sitt għasafar jistgħu jinqatlu għad-determinazzjoni bijokemikali (tlieta f'kull żewġ punti) u sitta jistgħu jibqgħu jgħixu tul il-perjodu ta' osservazzjoni għall-patoloġija ta' 21 jum.

Il-grupp ta' kontroll pożittiv jista' jseħħ fl-istess ħin jew ikun grupp ta' kontroll riċenti storiku. Għandu mill-inqas ikollu sitt tiġiġiet, trattati b'newrotossikant b'dewmien magħruf, tliet tiġiġiet għall-bijokemistrija u tliet tiġiġiet għall-patoloġija. Huwa rakkomandat laġġornament perjodiku tad-data storika. Data ġdida ta' kontroll pożittiv għandha tiġi żviluppata meta xi element essenzjali (eż. ir-razza, l-għalf u l-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew) ta kif isir it-test jinbidel mil-laboratorju attiv.

▼B

1.5.2.3. *Il-livelli tad-doża*

Għandu jsir studju preliminary bl-użu ta' numru xieraq ta' tiġieġ u ta' gruppi ta' livelli tad-doża sabiex jiġi stabbilit il-livell li se jintuża fl-istudju prinċipali. Il-mewt hija tipikament meħtieġa f'dan l-istudju preliminari sabiex tiġi stabbilita doża adegwata ta' l-istudju prinċipali. Madankollu, sabiex tiġi evitata il-mewt minħabba l-effetti *cholinergic* akuti, jista' jintuża *l-atropine* jew aġent protettiv ieħor magħruf li ma jfixkilx ir-rispons tad-dewmien fin-newrotossiċità. Varjetà ta' metodi għat-test jistgħu jintużaw biex tiġi kkalkulata d-doża massima mhux letali tas-sustanzi għat-test (Ara l-metodu B.1bis). Id-data storika fit-tiġieġa jew informazzjoni tossikoloġika oħra tista' tkun ta' għajnuna fl-għażla tad-doża.

Il-livell tad-doża tas-sustanza għat-test fl-istudju prinċipali għandu jkun għoli kemm jista' jkun waqt li jitqiesu ir-riżultati ta' l-istudju preliminari għall-għażla tad-doża u l-limitu fuqani tad-doża tal-piż tal-ġisem ta' 2 000 mg/kg. F'21 jum, kwalunkwe mortalità li tista' sseħħ m'għandhiex tfixkel is-sopravivenza ta' biżżejjed annimali għall-bijokemistrija (sitta) u għall-istoloġija (sitta). L-*atropine* jew aġent protettiv ieħor, magħruf li ma jfixkilx ir-rispons tad-dewmien fin-newrotossiċità, għandu jintuża sabiex tiġi evitata l-mewt minħabba effetti *cholinergic* akuti.

1.5.2.4. *It-test tal-limitu*

Jekk test f'livell wieħed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 2 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/ġurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika ħlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-ħtieġa li jiġi użat livell ogħla ta' doża.

1.5.3. **Il-perjodu ta' l-Osservazzjoni**

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun ta' 21 jum.

1.5.4. **Il-proċedura**

Wara s-somministrazzjoni ta' aġent protettiv sabiex jevita l-mewt minħabba l-effett *cholinergic* akut, is-sustanza għat-test tiġi somministrata f'doża waħda.

Osservazzjoni ġenerali

L-Osservazzjonijiet għandhom jibdew mill-ewwel wara l-espożizzjoni. It-tiġieġ kollu għandu jiġi osservat bosta drabi waqt l-ewwel jumejn imbagħad mill-inqas darba kuljum għall-perjodu ta' 21 jum jew sal-qtil skedat. Għandhom jiġu rrekordjati s-sinjali kollha tat-tossiċità, inklużi l-ħin ta' l-*onset*, it-tip, il-qawwa u d-dewmien ta' l-anormalitajiet fl-imġiba. *L-ataxia* għandha titkejjel fuq skala ordinali ta' gradazzjoni li tikkonsisti f'erba' livelli u l-paraliżi għandha tiġi nnutata. Mill-inqas darbtejn fil-ġimgħa t-tiġieġ magħżul għall-patoloġija għandu jinħareġ mill-gaġeġ u jiġi suġett għal perjodu ta' attività *forced motor*, bħal ngħidu aħna t-tlugħ mas-sellun, sabiex tiġi faċilitata l-osservazzjoni ta' l-effetti tossiċi minimali. L-annimali li qed imutu u dawk fi tbattija jew uġigħ għandhom jitneħħew, jinqatlu b'mod uman u sottomessi għan-nekropsija.

▼B

Il-piż tal-ġisem

It-tiġieġ kollu għandu jintizen eżatt qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u mill-inqas darba fil-ġimgħa wara dan.

Bijokemistrija

Sitt tiġiġiet jingħażlu bl-adoċċ minn kull grupp tal-mezz ta' kontroll u ta' trattament, u tliet tiġiġiet mill-grupp ta' kontroll pożittiv (meta dan il-grupp iseħħ fl-istess żmien), għandhom jinqatlu fi żmien ftit jiem wara d-dożaġġ. Il-moħħ u l-korda spinali lumbar jiġu mħejjija u analizzati għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-neuropath target esterase. Barra minn hekk, ittħejjija u l-analiżi tat-tessut tan-nerv xjatiku jistgħu jkunu ta' għajnuna għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-neuropath target esterase. Normalment, tlett għasafar tal-grupp ta' kontroll u ta' kull trattament jinqatlu wara 24 siegħa u tlieta jinqatlu wara 48 siegħa. It-tlett tiġiġiet tal-kontrolli pożittivi għandhom jinqatlu f'24 siegħa. Jekk l-osservazzjoni ta' sinjali kliniċi ta' intossikazzjoni (dan jista' jiġi evalwat permezz ta' l-osservazzjoni tal-ħin ta' *l-onset* tas-sinjali *cholinergic)* juru li l-aġent tossiku jista' jitwarrab bil-mod allura huwa preferibbli li jittieħed kampjun tat-tessut għal darbtejn minn kull wieħed mit-tlett għasafar bejn 24 sa 72 siegħa wara d-dożaġġ.

L-analiżi ta' l-acetylcholinesterase (AChE) tista' ssir ukoll fuq dawn il-kampjuni jekk ikun xieraq. Madankollu, ir-reattivazzjoni spontanja ta' l- AChE tista' sseħħ *in vivo*, u b'hekk twassal għal nuqqas ta' valutazzjoni dwar l-effikaċja tas-sustanza bħala inibitur AChE.

Nekropsija Grossa

In-nekropsija grossa ta' l-annimali kollha (skedati li jinqatlu u jinqatlu meta jkunu moribondi) għandha tinkludi l-osservazzjoni tad-dehra tal-moħħ u tal-korda spinali.

L-eżaminazzjoni Ispatologika

It-tessut newrali mill-annimali li jibqgħu ħajjin fil-perjodu ta' l-osservazzjoni u li ma jintużawx għal studji bijokemikali għandhom ikunu suġġetti għall-eżaminazzjoni mikroskopika. It-tessuti għandhom jiġu ffissati *in situ,* bl-użu ta' tekniki ta' perfużjoni. Is-sezzjonijiet għandhom jinkludu ċ-ċerebellum (il-livell mid-lonġitudinali), il-*medulla oblongata*, il-korda spinali, u n-nervituri periferali. Is-sezzjonijiet tal-korda spinali għandhom jittieħdu mill-parti ċervikali ta' fuq, miż-żoni *mid-thoracic* u *lumbo-sacral*. Għandhom jittieħdu sezzjonijiet miż-żona *distal* tan-nerv tibjali u l-friegħi tiegħu sal-muskolu *gastrocnemial* u tan-nerv xjatiku. Is-sezzjonijiet għandhom jittebbgħu bi tbajja speċifiċi xierqa ta' *myelin u ta' l-axon.*

2. **DATA**

Normalment ir-riżultati negattivi fuq l-*endpoints* magħżula f'dan il-metodu (l-osservazzjoni tal-bijokemistrija, ta' l-ispatoloġija u ta' l-imġiba) ma jitolbux iktar ittestjar għad-dewmien tan-newrotossiċità. Riżultati żbaljati jew inkonklussivi għal dawn *l-endpoints* jistgħu jitolbu evalwazzjoni addizjonali.

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun imqassra f'għamla tabulari, li turi n-numru ta' l-annimali għal kull grupp tat-test fil-bidu tiegħu, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, l-effetti ta' l-imġiba jew dawk bijokemikali, it-tip u l-gravità ta' dawn il-feriti jew effetti, u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip u gravità tal-feriti jew ta' l-effett.

▼B

Is-sejbiet ta' dan l-istudju għandhom jiġu elvawati f'termini ta' l-inċidenza, tal-gravità, u tal-korrelazzjoni tal-effetti ta' l-imġiba, ta' dawk bijokemikali u dawk ispatoloġiċi u kwalunkwe effetti oħra osservati fil-gruppi ta' kontroll u dawk trattati.

Ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati permezz ta' metodi ta' statistika xierqa u ġeneralment aċċettabbli. Il-metodi ta' statistika użati għandhom jiġu magħżula waqt id-disinn ta' l-istudju.

3. **RAPPORTAĠĠ**

IR-RAPPORTTAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk inhu possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

3.1. Annimali għat-test

— l-ispeċi użati;

— in-numru u l-età ta' l-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, eċċ,;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— id-dettalji tat-tħejjija tas-sustanza għat-test, l-istabilità u l-omoġeneità fejn hu xieraq;

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;

— id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma;

— Ir-rationale għall-għażla tad-doża;

— L-ispeċifikazzjoni tad-dożi somministrati, inklużi d-dettalji tal-mezz, tal-volum u tal-forma fiżika tal-materjal somministrat;

— L-identità u d-dettalji tas-somministrazzjoni ta' kwalunkwe aġent protettiv.

Riżultati:

— id-data tal-piż tal-ġisem;

— id-data tar-rispons tossiku fi grupp, inkluża l-mortalità;

— in-natura, l-gravità u d-dewmien taż-żmien ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (kemm jekk huma riversibbli jew le);

— deskrizzjoni dettaljata tal-metodi u s-sejbiet bijokemikali;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha ispatoloġiċi;

— fejn hu xieraq, it-trattament statistiku tar-riżultati.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

Dan il-metodu huwa analogu għal OECD TG 418.

▼B

B.38. **ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIĊITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* STUDJU TA' DOŻA RIPETUTTA GĦAL 28 ĠURNATA**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni ta' l-effetti tossiċi tas-sustanzi, huwa importanti li jiġi ikkonsidrat il-potenzjal ta' ċerti klassijiet ta' sustanzi biex jikkawża tipi speċifiċi ta' newrotossiċità li jistgħu ma jidrux fi studji tossiċi oħra. Ċerti sustanzi organophosphorus jidru li jikkawżaw dewmien tan-newrotossiċità u għandhom jitqisu kandidati għall-evalwazzjoni.

Testijiet ta' *screening in vitro* jistgħu jitħaddmu biex jiddentifikaw dawk is-sustanzi jistgħu jikkawżaw dewmien fil-*polyneuropathy*; madankollu, sejbiet negattivi fl-istudji *in vitro* ma jipprovdux evidenza li s-sustanza tat-test mhiex newrotossikant.

Dan it-test ta' 28 jum tad-dewmien tan-newrotossiċità jipprovdi l-informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibli li jista' jkun hemm minħabba espożizzjonijiet repetuti f'perjodu limitat ta' żmien. Jipprovdi informazzjoni fuq ir-rispons tad-doża u jista' jipprovdi kalkolu ta' *no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati), li jista' jkun utli sabiex jiġu stabbiliti l-kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sustanzi *organophosphorus* jinkludu *l- organophosphorus esters, it-thioesters uncharged* jew *l-anhydrides* ta' l-aċdi *organophosphoric, organophosphonic* jew *organophosphoramidic* jew ta' l-aċdi *phosphorothioic, phosphonothioic* jew *phosphorothioamidic* relatati, jew sustanzi oħra li jistgħu jikkawżaw dewmien ta' newrotossiċità li xi drabi tidher f'din il-klassi ta' sustanzi.

Id-dewmien tan-newrotossiċità huwa sindromu assoċjat ma' l-onset tad-dewmien prolungat ta' l-ataxia, id-distal axonopathies fil-korda spinali u n-nerv periferali, u l-inibizzjoni u x-xjuħija tan-*neuropathy target esterase (NTE*) fit-tessut newrali.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Id-dożi ta' kuljum tas-sustanza għat-test huma somministrati oralment lit-tiġieġ domestiku għal 28 jum. L-annimali jiġu osservati għallinqas kuljum għal anormalitajiet fl-imġiba, għall-*ataxia* u għall-paraliżi sa 14-il jum wara l-aħħar doża. Il-kejl bijokemikali, b'mod partikolari l-inibizzjoni *tan-neuropathy target esterase (NTE),* isir fuq it-tiġieġ li jingħażel bl-addoċċ minn kull grupp. Dan normalment isir 24 u 48 siegħa wara d-dożaġġ. Ħmistax wara l-aħħar doża il-bqija tat-tiġieġ jiġi maqtul u ssir eżaminazzjoni ispatoloġika tat-tessuti newrali magħżula.

▼B

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

Tiġieġ b'saħħtu u adult żagħżugħ li huwa ħieles minn mard virali u l-medikazzjoni li jfixxklu u li m'għandux anormalitajiet fil-mixja għandu jingħażel bl-adoċċ u assenjati għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament.Għandu wkoll jadatta għall kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 jiem qabel il-bidu ta' l-istudju.

Gaġeġ jew spazji magħluqa li huma kbar biżżejjed biex jippermettu ċ-ċaqliq ħieles tat-tiġieġ, u għandu jkun faċli biex tiġi osservata l-mixja tiegħu.

Id-dożaġġ orali kuljum, 7 ijiem fil-ġimgħa, għandu jitwettaq preferibbilment permezz ta' l-għalf mogħti bil-fors jew bis-somministrazzjoni tal-kapsuli tal-ġelatina. Il-likwidi jistgħu jingħataw mhux imħallta bl-ilma jew maħlula f'mezz xieraq bħal ma huwa ż-żejt tal-qamħ; jekk hu possibbli s-solidi għandhom jinħallu la darba dożi kbar tas-solidi fil-kapsuli tal-ġelatina jistgħu ma jiġux assorbiti sew. Għall-mezzi li mhumiex akwei il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa, u jekk le għandhom jiġu determinati qabel it-test.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

Annimali għat-test

It-tiġieġ żagħżugħ adult domestiku u li jbid (Gallus gallus domesticus), li għandu minn 8 sa 12-il xahar huwa rakkomandat. Għandhom jintużaw daqsijiet u razez standard. Normalment it-tiġieġ għandu jitrabba f'kundizzjonijiet li jippermettu ċ-ċaqliq ħieles.

In-numru u s-sess

Ġeneralment għandhom jintużaw mill-inqas tlett gruppi ta' trattament u grupp ta' kontroll tal-mezz. Il-grupp ta' kontroll tal-mezz għandu jiġi trattat bl-istess mod bħal dak ta' trattament ħlief li s-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test hija mneħħija.

Għandu jintużaw numru biżżejjed ta' tiġieġ f'kull grupp ta' għasafar sabiex mill-inqas sitt għasafar jistgħu jinqatlu għad-determinazzjoni bijokemikali (tlieta f'kull żewġ punti) u sitt għasafar jistgħu jgħixu waqt l-14-il jum tal-perjodu ta' osservazzjoni wara t-trattament għall-patoloġija.

Livelli tad-doża

Il-livelli tad-doża għandhom jingħażlu waqt li jitqiesu r-riżultati tat-test akut fuq id-dewmien tan-newrotossiċità u kwalunkwe tossiċità oħra li teżisti jew id-data kinetika disponibbli għall-*compound* tat-test. L-ogħla livell tad-doża għandu jingħażel bl-għan li jkun hemm żieda ta' effetti tossiċi, preferibbilment tan-newrotossiċità b'dewmien, iżda mhux ta' mewt jew tbatija ovvja. Wara, sekwenza nieżla tal-livelli tad-doża għandha tingħażel bl-għan li jidher kwalunkwe rispons relatat mad-doża u *no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati), fl-iktar livell ta' doża baxx.

▼B

Test ta' limitazzjoni

Jekk test f'livell wieħed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/ġurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika ħlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-ħtieġa li jiġi użat livell ogħla ta' doża.

Perjodu ta' l-Osservazzjoni

L-annimali kollha għandhom jiġu osservati mill-inqas kuljum waqt il-perjodu ta' l-espożizzjoni u 14-il jum wara, sakemm ma jkunx hemm nekropsija skedata.

1.4.3. **Proċedura**

Animals are dosed with the test substance on seven days per week for a period of 28 days.

Osservazzjoni ġenerali

L-osservazzjonijiet għandhom jibdew mill-ewwel wara li jibda t-trattament. It-tiġieġ kollu għandu jiġi osservat mill-inqas darba kuljum f'kull wieħed mit-28 jum ta' trattament, u għal 14-il jum wara d-dożaġġ jew sal-qtil skedat. Għandhom jiġu rrekordjati is-sinjali kollha ta' tossiċità inklużi il-ħin ta' l-*onset* tagħhom, it-tip, il-gravità u d-dewmien ta' żmien. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu, iżda mhux limitati għal, l-anormalitajiet ta' fl-imġiba. L-*ataxia* għandha titkejjel fuq skala ordinali ta' gradazzjoni li tikkonsisti f'erba' livelli, u għandha tiġi nnutata l-paraliżi. Mill-inqas darbtejn fil-ġimgħa it-tiġieġ għandu jittieħed barra l-gaġeġ u suġġett għal perjodu ta' attività *forced motor*, bħal ngħidu aħna t-tlugħ mas-sellum, sabiex tiġi faċilitata l-osservazzjoni ta' l-effetti tossiċi minimali. L-annimali moribondi li qed ibatu ħafna jew li huma muġugħa għandhom jitneħħew, jinqatlu b'mod uman u sottoposti għan-nekropsija.

Il-piż tal-ġisem

It-tiġieġ kollu għandu jintizen eżatt qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u mill-inqas darba fil-ġimgħa wara dan.

Bijokemistrija

Sitt tiġiġiet magħżula bl-addoċċ minn kull grupp ta' trattament u ta' kontroll tal-mezz, għandhom jinqatlu fi ftit jiem wara l-aħħar doża. Il-moħħ u l-korda spinali *lumbar* jiġu mħejjija u analizzati għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-*neuropath target esterase (NTE). B*arra minn hekk, it-tħejjija u l-analiżi tat-tessut tan-nerv xjatiku jistgħu jkunu ta' għajnuna għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-*neuropath target esterase (NTE)*. Normalment, tlett għasafar tal-grupp ta' kontroll u ta' kull trattament jinqatlu wara 24 siegħa u tlieta jinqatlu wara 48 siegħa wara l-aħħar doża. Jekk id-data mill-istudju akut jew studju ieħor (eż. it-tossikokinetiċi) turi li ħinijiet oħra tal-qtil wara d-dożaġġ finali huma preferibbli, mela għandhom jintużaw dawn il-ħinijiet u r-*rationale* tiġi dokumentata.

L-analiżi ta' l-acetylcholinesterase (AChE) tista' ssir ukoll fuq dawn il-kampjuni jekk ikun xieraq. Madankollu, ir-reattivazzjoni spontanja ta' l- AChE tista' sseħħ *in vivo*, u b'hekk twassal għal nuqqas ta' valutazzjoni dwar l-effikaċja tas-sustanza bħala inibitur AChE.

▼B

Nekropsija Grossa

In-nekropsija grossa ta' l-annimali kollha (skedati li jinqatlu u jinqatlu meta jkunu moribondi) għandha tinkludi l-osservazzjoni tad-dehra tal-moħħ u tal-korda spinali.

L-eżaminazzjoni Ispatologika

It-tessut newrali mill-annimali li jibqgħu ħajjin fil-perjodu ta' l-osservazzjoni u li ma jintużawx għal studji bijokemikali għandhom ikunu suġġetti għall-eżaminazzjoni mikroskopika. It-tessuti għandhom jiġu ffissati *in situ,* bl-użu ta' tekniki ta' perfużjoni. Is-sezzjonijiet għandhom jinkludu ċ-ċerebellum (il-livell mid-longitudinali), il-*medulla oblongata*, il-korda spinali, u n-nervituri periferali. Is-sezzjonijiet tal-korda spinali għandhom jittieħdu mill-parti ċervikali ta' fuq, miż-żoni *mid-thoracic* u *lumbo-sacral*. Għandhom jittieħdu sezzjonijiet miż-żona *distal* tan-nerv tibjali u l-friegħi tiegħu sal-muskolu *gastrocnemial* u tan-nerv xjatiku. Is-sezzjonijiet għandhom jittebbgħu bi tbajja speċifiċi xierqa ta' *myelin u ta ' l-axon.* Fil-bidu l-eżaminazzjoni mikroskopika għandha titwettaq fuq it-tessuti priservati tal-annimali kollha fil grupp ta' kontroll u f'dak ta' doża għolja. Fejn hemm evidenza ta' l-effetti fil-grupp ta' doża għolja, l-eżaminazzjoni mikroskopika għandha titwettaq ukoll fuq it-tiġieġ li qedgħin fil-gruppi ta' doża intermedjarja u baxxa.

2. **DATA**

Normalment ir-riżultati negattivi fuq l-*endpoints* magħżula f'dan il-metodu (l-osservazzjoni tal-bijokemistrija, ta' l-ispatoloġija u ta' l-imġiba) ma jitolbux iktar ittestjar għad-dewmien tan-newrotossiċità. Riżultati żbaljati jew inkonklussivi għal dawn *l-endpoints* jistgħu jitolbu evalwazzjoni addizjonali.

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun imqassra f'għamla tabulari, li turi n-numru ta' l-annimali għal kull grupp tat-test fil-bidu tiegħu, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, l-effetti ta' l-imġiba jew dawk bijokemikali, it-tip u l-gravità ta' dawn il-feriti jew effetti, u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip u gravità tal-feriti jew ta' l-effett.

Is-sejbiet ta' dan l-istudju għandhom jiġu elvawati f'termini ta' l-inċidenza, tal-gravità, u tal-korrelazzjoni tal-effetti ta' l-imġiba, ta' dawk bijokemikali u dawk ispatoloġiċi u kwalunkwe effetti oħra osservati fil-gruppi ta' kontroll u dawk trattati.

Ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati permezz ta' metodi ta' statistika xierqa u ġeneralment aċċettabbli. Il-metodi ta' statistika użati għandhom jiġu magħżula waqt id-disinn ta' l-istudju.

3. **RAPPORTAĠĠ**

IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk inhu possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

3.1. Annimali għat-test

— l-ispeċi użati;

— in-numru u l-età ta' l-annimali;

— is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, eċċ,;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

▼B

3.2. Kundizzjonijiet tat-test:

— id-dettalji tat-tħejjija tas-sustanza għat-test, l-istabilità u l-omoġeneità fejn hu xieraq;

— il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;

— id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;

— id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma;

— *Ir-rationale* għall-għażla tad-doża;

— L-ispeċifikazzjoni tad-doži somministrati, inklużi d-dettalji tal-mezz, tal-volum u tal-forma fiżika tal-materjal somministrat;

— *Ir-rationale* għall-għażla ta' ħinijiet oħra għad-determinazzjoni bijokemikali jekk mhux 24 u 48 siegħa.

3.3. Riżultati:

— id-data tal-piż tal-ġisem;

— id-data ta r-rispons tossiku permezz tal-livell tad-doża, inkluża l-mortalità;

— l-ebda livell ta' effett avvers osservat;

— in-natura, l-gravità u d-dewmien taż-żmien ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (kemm jekk huma riversibbli jew le);

— deskrizzjoni dettaljata tal-metodi u s-sejbiet bijokemikali;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha ispatoloġiċi;

— fejn hu xieraq, it-trattament statistiku tar-riżultati.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

Dan il-metodu huwa analogu għal OECD TG 419.

▼B

B.39. TEST *IN VIVO* TA' SINTESI MHUX PROGRAMMATA TA' DNA (UDS) FUQ ĊELLULI TAL-FWIED TAL-MAMMIFERI

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 486 *In vivo* ta' Sintesi Mhux Programmata ta' DNA (UDS) fuq Ċelloli tal-Fwied tal-Mammiferi (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

L-għan tat-test *in vivo* ta' sintesi mhux programmata ta' DNA (UDS) fuq Ċelloli tal-fwied tal-mammiferi huwa biex jiġu identifikati sustanzi tat-test li joħolqu t-tiswija tad-DNA f'Ċelloli tal-fwied ta' annimali ttrattati (1), (2), (3), (4).

Dan it-testr *in vivo* jipprovdi metodu għall-investigazzjoni ta' l-effetti ġenotossiċi ta' kimiċi fil-fwied. Il-punt ta' l-aħħar imkejjel jagħti indikazzjoni tal-ħsara fid-DNA u t-tiswija sussegwenti fiċ-Ċelloli tal-fwied. Il-fwied ġeneralment huwa l-lok maġġuri tal-metabolismu ta' komposti assorbiti. Għalhekk huwa l-lok xieraq biex titkejjel il-ħsara fid-DNA *in vivo*.

Jekk ikun hemm prova li s-sustanza tat-test mhix ser tilħaq it-tessut immirat, mhuwiex xieraq li jintuża dan it-test.

L-aħħar punt ta' sintesi DNA (UDS) mhux programmata jitkejjel billi jiġi stabbilit l-assorbiment ta' nukleosidi mmarkati f'Ċelloli li ma jkunux għaddejin minn sintesi tad-DNA programmata (fasi S). Il-metodu ta' teknika l-aktar użat huwa d-determinazzjoni ta' l-assorbiment ta' tritium thymidine immarkat (3H-TdR) bl-awtoradjografija. Preferibbilment jintużaw il-fwied tal-far għat-testijiet *in vivo*. Jistgħu jintużaw tessuti oħra minklok il-fwied, iżda mhumiex is-suġġett ta' dan il-metodu.

L-iżvelar ta' rispons UDS jiddependi fuq in-numru ta' bażi DNA exxissi u mibdula fuq il-lok tal-ħsara. Għalhell, it-test UDS huwa partikolarment ta' valur biex tiġi żvelata r-riparazzjoni ta' segwenzi twal li jiġu mis-sustanza (20 sa 30 bażijiet). Bħala kuntrast, ir-riparazzjoni ta' segwenzi qosra (minn bażi waħda sa tlieta) tiġi żvelata b'sensitività anqas qawwija. Barra minn dan, jistgħu jirriżultaw ġrajjiet mutaġeniċi minħabba fin-nuqqas ta' riparazzjoni, riparazzjoni ħażina jew replikazzjoni ħażina tal-leżjonijiet fid-DNA. L-estensjoni tar-rispons tal-UDS ma tagħtix indikazzjoni dwar il-fedeltà tal-proċess ta' riparazzjoni. B'żieda ma' dan, huwa possibbli li li mutaġen jirreaġixxi mad-DNA iżda l-ħsara fid-DNA ma tissewwix permezz ta' proċess ta' riparazzjoni exissa. In-nuqqas ta' informazzjoni speċifika dwar l-attività mutaġenika mogħtija mit-test tal-UDS huwa kompensat bis-sensitività potenzali ta' dan il-punt aħħari għax jiġi mkejjel fil-ġenomu sħiħ.

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali Taqsima B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ċelloli li qed jissewwew: Ċelloli li l-numru ta' grani nukleari netti tagħhom (NNG) huwa ogħla minn valur determinat minn qabel, li għandu jiġi ġustifikat fil-laboratorju li fih jitwettaq it-test.

Grani nukleari netti (NNG): miżura kwantitattiva għall-attività UDS taċ-Ċelloli f'testijiet UDS awtoradjografiċi, kalkolati billi jitnaqqas in-numru medju ta' grani ċitoplasmiċi f'arei ċitoplasmiċi nukei ekwivalenti (CG) min-numru ta' grani nukleari (NG): NNG = NG - CG. L-għadd ta' NNG huma kalkolati għal Ċelloli individwali u imbagħad addizzjonati ma' Ċelloli f'kultura, f'kulturi paralleli, eċċ.

▼B

Sintesi DNA mhux skedata (UDS): sintesi ta' riparazzjoni DNA wara l-exissjoni u t-tneħħija ta' biċċa mid-DNA li jkun fiha reġjun ta' ħsara miġjuba minn sustanzi kimiċi jew aġenti fiżiċi.

1.3. PRINĊIPJI TA' DAN IL-METODU TA' TEST

It-test tal-UDS b'Ċelloli tal-fwied ta' mammiferi *in vivo* jindika sintesi ta' riparazzjoni DNA wara l-exissjoni u t-tneħħija ta' biċċa mid-DNA li jkun fiha reġjun ta' ħsara miġjuba minn sustanzi kimiċi njew aġenti fiżiċi. It-test hu normalment msejjes fuq l-inkorporazzjoni ta' 3H-TdR fiċ-ċelluli DNA tal-fwied li għandhom frekwenza baxxa ta' Ċelloli fil-fasi S taċ-ċiklu taċ-Ċelloli. It-teħid ta' 3H-TdR jiġi normalment stabbilit bl-awdjoradjografija, għax dan il-metodu ta' teknika mhuwiex suxxettibbli għal indħil minn Ċelloli fil-fasi S bħal, per eżempju, konteġġ ta' xintillazzjoni fil-fasi likwida.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Selezzjonijiet ta' l-ispeċi ta' annimali*

Normalment jintuża l-far, minkejja li tista' tintuża kull speċi xierqa ta' mammiferi. Għandhom jintużaw partijiet ġeneralment użati fil-laboratorju ta' annimali żgħar b'saħħithom adulti. Fil-bidu ta' l-istudju l-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali għandha tkun minima u ma tkunx iżjed minn ± 20 % tal-piż medju għal kull wieħed mis-sessi.

1.4.1.2. *Kondizzjoinijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu*

Jiġu applikati l-kundizzjonijiet ġenerali msemmija fl-Introduzzjoni ġenerali għat-Taqsima B għalhemm il-mira għall-umdità għandha tkun ta' 50 sa 60 %.

1.4.1.3. *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Annimali b'saħħithom żgħar adulti jiġu assenjati mingħajr ordni għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'tali mod li jitnaqqsu l-effetti possibbli mil-fatt li jitqiegħdu f'gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati wieħed wieħed u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għallinqas għal ħamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

1.4.1.4. *Sustanza tat-test/preparazzjoni*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewwbin jew sospiżi f'solventi jew kontenituri xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament ta' l-annimali. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiġu ttrattati direttament jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda għas-sustanza tat-test kemm-il darba l-informazzjoni dwar l-istabbilità ma turix laċċettabbilità tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Is-solvent/mezz ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doża użata, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanza tat-test. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra minflok dawk l-aktar magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Hu rakkomandat li kemm jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolli*

Għandhom jiġu inklużi f'kull parti indipendenti ta' l-esperiment kontrolli pożittivi u negattivi fl-isterss ħin (solvent/mezz). Ħlief għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod bħall-annimali fil-grupp ta' trattament.

Il-kontrolli pożittivi għandhom ikunu sustanzi magħrufa li jipproduċu UDS meta somministrati f'livelli ta' espożizzjoni li huma meqjusa li jagħtu żieda li wieħed jista' jinnota fuq l-isfond. Kontrolli pożittivi li jeħtieġu attivazzjoni metabolika għandhom jintużaw f'dożi li joħolqu rispons moderat (4). Id-dożi jistgħu jingħażlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tad-dijapożitivi kodifikati lil min jaqrahom. Eżempji ta' sustanzi ta' kontroll pożittivi jinkludu:

Ħinijiet ta' teħid ta' kampjuni	Sustanza	Nru CAS	Nru EINECS
Teħid ta' kampjuni kmieni (2 sa 4 sigħat)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Teħid ta' kampjuni tard (12 sa 16-il siegħa)	N-2-fluworenilaċetamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi oħra xierqa. Huwa aċċettabbli li l-kontroll pożittiv għandu jiġi somministrat minn rotta differenti mis-sustanza tat-test.

1.5. PROĊEDURA

1.5.1. **Numru u sess ta' l-annimali**

Għandu jintuża numru adegwat ta' annimali biex titqies il-varjazzjoni bijoloġika naturali f'rispons ta' test. In-numru ta' annimali għandu jkun għall-inqas tliet annimali analizzabbli kull grupp. Fejn ikun ġie akkumulat database storiku sinjifikattiv, annimal wieħed jew tnejn biss jkunu meħtieġa għall-gruppi ta' kontroll pożittivi u negattivi fl-istess ħin.

Jekk fil-ħin li jsir l-istudju jkun hemm informazzjoni disponibbli minn studji fl-istess speċje u li jużaw l-istess rotta ta' espożizzjoni li juru li ma hemms differenzi sostanzjali fit-tossiċità bejn is-sessi, allura jkun biżżejjed li t-test isir fuq sess wieħed, preferibbilment dak maskil. Fejn l-espożizzjoni umana għall-kimiċi tista' tkun speċifika skond is-sess, bħal ma hu per eżempju għal ċerti aġenti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq.

1.5.2. **Skeda tat-trattament**

Is-sustanzi tat-test ġeneralment jiġu somministrati fi trattament singolu.

1.5.3. **Livelli tad-doża**

Normalment, jintużaw għall-inqas żewġ livelli ta' doża. L-ogħla doża hija mfissra bħala d-doża li tipproduċi sinjali ta' tossiċità hekk li livelli ogħla tad-doża, bbażati fuq l-istess reġim ta' dożaġġ, huma mistennija li jikkawżaw il-mewt. Ġeneralment, l-inqas doża għandha tkun minn 50 % sa 25 % ta' l-ogħla doża.

▼B

Is-sustanzi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi baxxi mhux tossiċi (bħal ma huma ormoni u nitroġeni) jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' l-issettjar tad-doża u għandhom jiġu valutati fuq bażi ta' każ b'każ. Jekk isir studju biex tinstab il-medda għax ma jkunx hemm disponibbli informazzjoni xierqa, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, billi jintużaw l-istess speċji, karatteristiċi, sess u dożaġġ ta' trattament li jintuża fl-istudju prinċipali.

L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fil-fwied (eż. nukleji piknotiċi).

1.5.4. **Test tal-limitu**

Jekk test ta' doża waħda ta' livell ta' għall-inqas 2 000 mg/kg piż tal-ġisem, meta jitwettaq trattament wieħed, jew bħala żewġ trattamenti fl-istess ġurnata, ma jipproduċix effetti tossiċi li wieħed jinduna bihom, u jekk ma tkunx mistennija l-ġenotossiċità fuq il-bażi ta' l-informazzjoni minn sustanzi strutturalment relatati, allura ma jitqiesx li jkun neċessarju li jsir studju komplet. L-espożizzjoni umana mistennija tista' tindika l-ħtieġa ta' livell ogħla ta' doża li għandu jintuża fit-test tal-limitu.

1.5.5. **Somministrazzjoni ta' doży**

Normalment is-sustanza tat-test tiġi somministrata b'gavage billi jintuża tubu għall-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni. Fejn ikunu ġustifikati, jistgħu jiġu aċċettati rotot oħra ta' espożizzjoni. Madankollu r-rotta intraperitonali mhix rakkomandata għax tista' tesponi l-fwied direttament għas-sustanza tat-test minflok permezz tas-sistema ċirkolatorja. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jiġi somministrat b'gavage jew b'injezzjoni f'ħin wieħed jiddependi fuq il-qies ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 2 ml/100g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ogħla minn dawn għandu jkun ġustifikat. Ħlief fil-każ ta' sustanzi li jirritaw jew korroživi li normalment juru effetti aggravati b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbilità fil-volum tat-test għandha titnaqqas bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fuq il-livelli kollha tad-doża.

1.5.6. **Preparazzjoni taċ-Ċelloli tal-fwied**

Iċ-Ċelloli tal-fwied huma ppreparati minn annimali ttrattati normalment 12 sa 16-il siegħa wara t-teħid tad-doża. Ġeneralment ikun meħtieġ teħid ta' kampjuni ieħor addizzjonali u aktar kmieni (normalmeny sagħtejn sa erba' sigħat wara t-trattament) kemm-il darba ma jkunx hemm rispons pożittiv ċar fi 12 sa 16-il siegħa. Madankollu t-teħid ta' kampjuni jista' jsir f'ħinijiet oħra meta jkun ġustifikat fuq il-bażi ta' informazzjoni tossikokinetika.

Normalment il-kulturi ta' perjodu qasir ta' Ċelloli ta' manniferi jiġu stabbiliti billi l-fwied jitgħatta fil-post bil-kollaġenas u billi Ċelloli tal-fwied dissoċjati ġodda jitħallew jingħaqdu ma' superfiċji xierqa. Ċelloli tal-fwied minn annimali ta' kontroll negattiv għandu jkollhom vijabilità ta' għall-inqas 50 %.

1.5.7. **Determinazzjoni ta' UDS**

Iċ-Ċelloli tal-fwied iżolati ġodda tal-mammiferi huma inkubati normalment b'medjum li jkun fih 3H-TdR għal tul ta' żmien xieraq, eż. tliet sigħat sa tmienja. Fl-aħħar tal-perjodu ta' inkubazzjoni, il-medjum għandu jitneħħa miċ-Ċelloli, li imbagħad jistgħu jiġu inkubati b'medjum li jkun fih eċċess ta' timidina mhux ittikkettjata biex tnaqqas r-radjuattività mhux inkorporata ('cold chase'). Imbagħad iċ-Ċelloli jiġu mlaħalħa, ffissati u mnixxfin. Għal ħinijiet ta' inkubazzjoni itwal, il-cold chase jista' ma jkunx neċessarju. Id-dijapożittivi jixxarbu b'emulsjoni awtoradjografika, jiġu esposti fid-dlam (eż. imkessħin għal sebat ijiem sa erbatax-il ġurnata), żviluppati, mogħtika l-kulur, u jingħaddu il-grani tal-fidda esposti. Jiġu ppreparati żewġ jew tliet dijapożittivi minn kull annimal.

▼B

1.5.8. **Analiżi**

Il-preparazzjonijiet tad-dijapożittivi għandu jkollhom biżżejjed Ċelloli ta' morfoloġija normali li jippermettu valutazzjoni xierqa tal-UDS. Il-preparazzjonijiet jiġu eżaminati mikroskopikament għal sinjali ta' tossiċita qawwija (eż. piknoži, livelli ridotti ta' radjutik-kettjar).

Id-dijapożittivi għandhom jiġu kodifikati qabel ma jibda l-għadd tal-grani. Normalment jingħaddu 100 ċellula minn kull annimal minn għall-inqas żewġ dijapożittivi; l-għadd ta' inqas minn 100 ċellula/-annimal għandu jkun ġustifikat. In-numru ta' grani ma jingħaddx għan-nuklei tal-fasi S, iżda tista' tiġi reġistrata l-proporzjon ta' Ċelloli tal-fasi S.

L-ammont ta' inkorporazzjoni ta' 3H-TdR fin-nuklei u ċ-ċitoplasma ta' Ċelloli morfoloġikament normali, kif ppruvat bid-deposizzjoni ta' grani tal-fidda, għandu jiġi stabbilit b'metodi xierqa.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Għandha tingħata informazzjoni individwali dwar dijapożittivi u annimali. Barra minn dan. L-informazzjoni kollha għandha titqassar f'forma ta' tabella. L-għadd ta' g rani nukleari netti (NNG) għandu jiġi kalkolat għal kull ċellula, għal kull annimal u għal kull doża u ħin billi jitnaqqsu l-għadd ta' CG mill-għadd ta' NG. Jekk jingħaddu "iċ-Ċelloli li qed jissewwew", il-kriterji għaċ-Ċelloli li qed jissewwew għandhom ikunu ġustifikati u msejsa fuq informazzjoni storika u ta' kontroll negattiv fl-istess ħin. Riżultati numeriċi jistgħu jiġu valutati b'metodi statistiċi. Jekk jintużaw, it-testijiet statistiċi għandhom jingħażlu u jkunu ġustifikati qabel ma jitwettaq l-istudju.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Eżempji ta' kriterji għal rispons pożittiv/negattiv jinkludu:

pożittiv
(i) il-valuri NNG ogħla minn limitu determinat minn qabel li hu ġustifikat fuq il-bażi ta' informazzjoni storika tal-laboratorju; jew
(ii) il-valuri NNG sinjifikatament ogħla minn kontroll fl-istess ħin;

negattiv
(i) il-valuri NNG fil-limitu/taħt il-limitu ta' kontroll storiku jew
(ii) il-valuri NNG mhux sinjifikatament ogħla minn kontroll fl-istess ħin

▼B

Għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika ta' l-informazzjoni: jiġifieri għandhom jitqiesu l-parametri bħal ma huma l-varjazzjoni bejn l-annimali, r-relazzjoni għar-rispons għad-doża u ċ-ċitossiċità. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet, jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. Madankollu, s-sinjifikanza statistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur għal rispons pożittiv.

Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività ta' sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ekwivoċi u inċerti irrispettivament min-numru ta' drabi li jirrepeti ruħu l-esperiment.

Riżultat pożittiv minn test UDS b'Ċelloli tal-fwied tal-mammiferi *in vivo* jindika li s-sustanza tat-test toħloq ħsara fid-DNA taċ-Ċelloli tal-fwied tal-mammiferi *in vivo* li tista' tissewwa b'sintesi tad-DNA mhux skedata *in vitro*. Riżultat negattiv jindika li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloqx ħsara fid-DNA li tiġi żvelata b'dan it-test.

Għandha tiġi diskussa l-probabilità li s-sustanza tat-test tilħaq iċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew speċifikatament it-tessut immirat (eż. tossiċità sistemika).

3. **RAPPORTAĠĠ**

RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz,

— solubbilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Annimali ttestjati:

— speċi/razza użati;

— numru, età u sess ta' l-annimali;

— għejun, kundizzjonijiet dwar fejn jinżammu, dieta, eċċ.;

— piż individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test, inkluża l-medda ta' piż tal-ġisem, mezzi u devjazzjoni standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

— kontrolli pożittivi u negattivi (mezz/solvent);

— informazzjoni mill-istudju dwar il-medda, jekk ikun sar;

— raġuni prinċipali għall-għażla ta' livell tad-doża;

— dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test;

— dettalji dwar is-somministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— raġuni prinċipali dwar ir-rotta ta' somministrazzjoni;

— metodi biex jiġi verifikat li s-sustanza tat-test waslet għaċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew it-tessut immirat, jekk tkun applikabbli;

— konverżjoni mill-konċentrazzjoni (ppm) tas-sustanza tat-test dieta/ilma għax-xorb għad doża attwali (mg/kg piż tal-ġisem/jum) jekk tkun applikabbli;

▼B

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma;

— deskrizzjoni dettaljata dwar l-iskedi ta' trattament u teħid ta' kampjuni;

— metodi biex titqies it-tossiċità;

— metodu tal-preparazzjoni u kultura taċ-Ċelloli tal-fwied;

— teknika awtoradjografika użata;

— numru ta' dijapożitivi ppreparati u numru ta' Ċelloli li jingħaddu;

— kriterji ta' valutazzjoni;

— kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi.

Riżultati:

— valuri medji individwali tad-dijapożittivi, ta' l-annimali u ta' gruppi għal grani nuklei, grani ċitoplasmiċi, u grani nukleari netti;

— relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, jekk tkun disponibbli;

— valutazzjoni statistika, jekk ikun hemm;

— sinjali ta' tossiċità;

— informazzjoni dwar kontroll pożittiv u negattiv (solvent/mezz) fl-istess ħin;

— informazzjoni dwar kontroll pożittiv u negattiv (solvent/mezz) storika bil-medda, mezzi u devjazzjonijiet standard;

— numru ta' Ċelloli li qed jissewwew, jekk magħruf;

— numru ta' Ċelloli tal-fasi S, jekk magħruf;

— vijabilità taċ-ċelluli.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

(1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In vivo* Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 123-133.

(3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), *In vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla. G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In vitro* and *In vivo*, Mutation Res., 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In vivo*/*In vitro* DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In vivo*/*In vitro* Hepalocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553-562.

▼B

B.40. **IL-KORROŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANJA (TER – TRANSCUTANEAL ELECTRICAL RESISTANCE)**

1. **IL-METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 430 (2004).

1.1. DAĦLA

Il-korrożjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fit-tessut tal-ġilda wara l-applikazzjoni ta' materjal tat-test [kif definit mis-Sistema Globali Armonizzata għall-Klassifika u t-Tikkettjar ta' Sustanzi u Komposti Kimiċi (GHS – *Globally Harmonised System*)] (1). Dan il-metodu jipprovdi proċedura li biha l-istima tal-korrożività ma ssirx f'annimali ħajjin.

L-istima tal-korrożività tal-ġilda involviet tipikament l-użu ta' annimali tal-laboratorju (2). Ittħassib għall-uġigħ u t-tbatija ta' l-annimali involuti f'din il-proċedura ġie indirizzat fir-reviżjoni tal-Metodu tat-Test B.4 li jippermetti d-determinazzjoni tal-korrożività tal-ġilda bl-użu ta' metodi alternattivi, *in vitro,* li jevitaw l-uġigħ u t-tbatija.

L-ewwel pass biex jiġu definiti testijiet alternattivi li jistgħu jintużaw għall-ittestjar tal-korrożività tal-ġilda kien it-twettiq ta' studji tal-validazzjoni minn qabel (3). Wara dan, studju ta' validazzjoni formali ta' metodi *in vitro* biex tiġi stmata l-korrożjoni tal-ġilda (4)(5) ġie mwettaq (6)(7)(8). Ir-riżultat ta' dawn l-istudji u letteratura oħra ppubblikata wasslu għar-rakkomandazzjoni li jistgħu jintużaw dawn it-testijiet għall-istima tal-korrożività tal-ġilda *in vivo* (9)(10)(11): it-test tal-mudell tal-ġilda umana (ara l-Metodu tat-Test B.40bis) u t-test tar-reżistenza elettrika transkutanja (dan il-Metodu).

Studji ta' validazzjoni u studji oħrajn validati rrapportaw li l-figura tar-reżistenza elettrika transkutanja (TER) l-ġilda tal-firien (12)(13) tista' tiddiskrimina fis-sod bejn il-korrożivi tal-ġilda magħrufin u sustanzi mhux korrożivi (5)(9).

It-test deskritt f'dan il-Metodu jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi u komposti kimiċi korrożivi. Jippermetti wkoll l-identifikazzjoni ta' sustanzi u komposti mhux korrożivi meta tkun sostnuta mill-piż ta' determinazzjoni tal-provi bl-użu ta' informazzjoni oħra eżistenti (eż. pH, struttura-attività-relazzjonijiet, data dwar l-umani u/jew l-annimali) (1)(2)(11)(14). Ma jagħtix informazzjoni dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, u lanqas ma jippermetti s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi korrożivi kif permess fis-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata (GHS) (1).

Għal evalwazzjoni sħiħa ta' l-effetti lokali fuq il-ġilda wara espożizzjoni dermali unika, huwa rakkomandat li tiġi segwita l-istrateġija ta' l-ittesttjar sekwenzjali kif mehmuża mal-Metodu tat-Test B.4 (2) u provduta fis-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata (1). Din l-istrateġija ta' l-ittestjar tinkludi t-twettiq ta' testijiet *in vitro* għall-korrożjoni tal-ġilda (kif deskritt f'dan il-metodu) u l-irritazzjoni tal-ġilda qabel ma jitqies l-ittestjar fl-annimali ħajjin.

▼B

1.2. DEFINIZZJONI

Il-korrożjoni tal-ġilda *in vivo*: hija l-produzzjoni ta' dannu irriversibbli tal-ġilda: jiġifieri nekrożi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrożivi hima tipifikati minn ulċeri, ħruġ ta' demm, qxur bid-demm, u sa l-aħħar ta' l-osservazzjoni ta' 14-il jum, tnaqqis ta' kulur minħabba li tibjad il-ġilda, żoni sħaħ ta' *alopecia*, u ċikatriċi. Il-ħistopatoliġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

Ir-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER): hija kejl ta' l-impendenza tal-ġilda, bħala valur ta' reżistenza f'kilo Ohms. Metodu sempliċi u robust biex tiġi stmata l-funzjoni ta' barrjera bir-rekordjar tal-passaġġ tal-joni mill-ġilda bl-użu ta' apparat *Wheatstone bridge*.

IS-SUSTANZI TA' RIFERENZA

Tabella 1

Il-Kimiċi ta' Riferenza

Isem	Nru EINECS	Nru CAS	
1,2-Diaminopropane	201-155-9	78-90-0	Korrożiv Ħafna
Aċidu Akriliku	201-177-9	79-10-7	Korrożiv Ħafna
2-tert. Butylphenol	201-807-2	88-18-6	Korrożiv
Idrossidu tal-potassju (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrożiv
Aċidu sulfuriku (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrożiv
Aċidu Oktanoiku (aċidu kapriliku)	204-677-5	124-07-02	Korrożiv
4-Amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Mhux Korrożiv
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Mhux Korrożiv
Phenethyl bromide	203-130-8	103-63-9	Mhux Korrożiv
Tetrachloroethylene	204-825-9	27-18-4	Mhux Korrożiv
Aċidu iżosteariku	250-178-0	30399-84-9	Mhux Korrożiv
4-(Methylthio)-benzaldehyde	222-365-7	3446-89-7	Mhux Korrożiv

Il-parti l-kbira tal-kimiċi elenkati huma meħuda mil-lista ta' kimiċi magħżula għall-istudju internazzjonali ta' validazzjoni ECVAM (4). L-għażla tagħhom hija bbażata fuq dawn il-kriterji li ġejjin:

i) għaddu indaqs ta' sustanzi korrożivi u mhux korrożivi;

▼B

ii) sustanzi disponibbli kummerċjalment li jkopru l-parti l-kbira tal-klassijiet ta' kimiċi rilevanti;

iii) l-inklużjoni ta' sustanzi korrożivi ħafna kif ukoll dawk inqas korrożivi sabiex tkun possibbli d-diskriminazjoni bbażata fuq il-potenza korrożiva;

iv) l-għażla tal-kimiċi li jistgħu jiġu mmaniġġjati f laboratorju mingħajr periklu serju minbarra l-korrożività.

IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-materjal tat-test huwa applikat għal mhux aktar minn 24 siegħa fuq l-uċuħ epidermali ta' ċrieki ta' ġilda f sistema ta' test b'żewġ kompartimenti fejn iċ-ċrieki ta' ġilda jaħdmu bħala s-separazzjoni bejn il-kompartimenti. Iċ-ċrieki tal-ġilda jittieħdu minn firien maqtula b'mod uman ta' età ta' 28-30 jum. Il-materjali korriżivi huma identifikati mill-abilità tagħhom li jipproduċu telf ta' integrita normali ta' *stratum corneum* u tal-funzjoni ta' barrjera, li jitkejjel bħala tnaqqis fit-TER 'l isfel minn livell ta' limitu (12). Għat-TER tal-firien, intgħażel valur ta' limitu ta' 5 k Ω ibbażat fuq data estensiva għal varjetà kbira ta' kimiċi fejn il-maġġoranza l-kbira ta' valuri kienu jew sew aktar 'il fuq (spiss > 10 kΩ), jew sew aktar 'l isfel (spiss < 3 kΩ) minn dan il-valur (12). B'mod ġenerali, il-materjali li mhumiex korrożivi fl-annimali iżda li huma irritanti jew mhux irritanti ma jnaqqsux it-TER inqas minn dan il-valur ta' limitu. Barra minn hekk, l-użu ta' preparazzjonijiet ta' ġilda oħrajn jew tagħmir ieħor jista' jibdel il-valur ta' limitu, li jeħtieġ aktar validazzjoni.

Huwa inkorporat fil-proċedura tat-test pass li jorbot iż-żebgħa sabiex isir it-test ta' konferma tar-riżultati pożittivi fit-TER inklużi valuri madwar 5 kΩ. Il-pass li jorbot iż-żebgħa jiddetermina jekk iż-żjieda fil permeabilità ionika hijiex minħabba qirda fiżika *tal-istratum corneum*. Il-metodu tat-TER bl-użu tal-ġilda tal-firien wera li jista' jbassar il-korrożività *in vivo* fil-fenek evalwat taħt il-Metodu tat-Test B.4 (2). Għandu jiġi nnutat li t-test tal-fenek *in vivo* huwa konservattiv ħafna fir-rigward tal-korrożività tal-ġilda u l-irritazzjoni tal-ġilda meta mqabbel mat-test tal-parti tal-ġilda umana (15).

DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

L-Annimali

Il-firien huma l-ispeċi ta' għażla minħabba li s-sensittività tal-ġilda tagħhom għall-kimiċi f dan it-test diġa ntweriet qabel (10). L-età (meta tingħabar il-ġilda) u l-ispeċi tal-far huma partikolarment importanti biex jiġi żgurat li l-follikoli tax-xahar fil-fażi dormanti qabel ma jibda t-tkabbir tax-xahar adult.

▼B

Ix-xahar dorsali u tal-ġenb minn firien żgħar, ta' età ta' madwar 22 jum (derivati minn Wistar jew fergħa komparabbli), jitneħħa bir-reqqa b'qattiegħ ix-xahar żgħir. Imbagħad l-annimali jiġu maħsula billi jintmesħu bl-attenzjoni, filwaqt li l-parti bix-xagħar maqtugħ tiġi mgħarrqa ftaħlita antibijotika (li per eżempju, fuha streptomycin, penisilin, chloramphenicol, u amphotericin, f konċentrazzjonijiet li huma effettivi biex jinibixxu t-tkabbir tal-batterji). L-annimali jerġgħu jiġu maħsula bl-anitibjotiċi fit-tielet jew ir-raba' jum wara l-ewwel ħasla u jintużaw fi żmien 3 ijiem wara t-tieni ħasla, meta l-i*stratum corneum* ikun irkupra mit-tneħħija tax-xahar.

Il-preparazzjoni taċ-ċrieki tal-ġilda

L-annimali jiġu maqtula b'mod uman meta jkollhom 28-30 jum; l-età hija kritika Il-ġilda dorso-laterali ta' kull annimal imbagħad titneħħa u jitneħħielha x-xaħam subkutanju eċċessiv billi jitqaxxar bl-attenzjoni minn mal-ġilda Iċ-ċrieki tal-ġilda, ta' djametru ta' madwar 20 mm kull wieħed, jitneħħew. Il-ġilda tista' tiġi maħżuna qabel ma jintużaw iċ-ċrieki fejn jidher li d-data tal-kontroll pożittiva u negattiva hija ekwivalenti għal dik miksuba b'ġilda friska.

Kull ċirku tal-ġilda jitqiegħed fuq wieħed mit-truf ta' tubu PTFE (polytetrafluoroethylene), li jiżgura li l-wiċċ epidermali huwa f kuntatt mat-tubu. Ċirku "O" tal-gomma huwa mwaħħal billi jingħafas mat-tarf tat-tubu biex il-ġilda tinżamm f postha u t-tessut żejjed jiġi maqtugħ. Id-dimensjonijiet tat-tubu u taċ-ċirku "O" jintwerew fil-Figura 2. Iċ-ċirku "O" tal-ġilda imbagħad jiġi ssiġġillat bir-reqqa mat-tarf tat-tubu PTFE bl-ingwent. It-tubu huwa appoġġjat minn molla ġewwa parti reċettorja li fiha taħlita ta' $MgSO_4$ (154 mM) (Figura 1). Iċ-ċirku tal-ġilda għandha tiġi għal kollhox meqruda fit-taħlita ta' $MgSO_4$. Minn ġilda ta' far wieħed jistgħu jinkisbu daqs 10 – 15 ċirku tal-ġilda.

Qabel ma jibdew it-testijiet, ir-reżistenza elettrika ta' żewġ ċrieki tal-ġilda tiġi mkejla bħala proċedura tal-kontroll tal-kwalità għal kull ġilda ta' l-annimali. Iż-żewġ ċrieki għandhom jagħtu valuri ta' reżistenza akbar minn 10 kΩ biex jintużaw il-bqija taċ-ċrieki għat-test. Jekk il-valur tar-reżistenza huwa inqas minn 10 kΩ, il-bqija taċ-ċrieki minn dik il-ġilda għandha tintrema.

L-applikazzjoni tat-test u s-sustanzi tal-kontroll

Għandhom jintużaw kontrolli konkurrenti pożittivi u negattivi biex kull studju jiżgura ħidma tajba tal-mudell esperimentali. Għandhom jintużaw ċ-ċrieki tal-ġilda minn animal wieħed. Is-sustanzi tal-kontroll pożittivi jew negattivi suġġeriti huma 10 M aċidu idrokloriku u ilma ddistillat, rispettivament.

Is-sustanzi tat-test likwidi (150 µL) huma applikati b'mod uniformi mal-wiċċ eipdermali ġewwa t-tubu. Meta jiġu ttestjati materjali solidi, huwa applikat ammont biżżejjed ta' solidu b'mod livell fuq iċ-ċirku sabiex jiġi żgurat li l-wiċċ kollu ta' l-epidermis huwa kopert. Jiżdied l-ilma deioniżżat (150 µL) fuq is-solidu u t-tubu jiġi aġitat bil-mod. Sabiex jinkiseb il-kuntatt massimu mal-ġilda, is-solidi jistgħu jkunu jridu jissaħħnu sa 30 ºC biex tinħall jew tiġi mrattba s-sustanza tat-test, jew miħuna sabiex jipproduċu materjal granurali jew terra.

▼B

Jintużaw tliet ċrieki tal-ġilda għal kull sustanza tat-test u tal-kontroll. Is-sustanzi tat-test huma aplikati għal 24 siegħa f'temperatura ta' 20-23 C. Is-sustanza tat-test titneħħa bil-ħasil b'merżuq ta' ilma tal-vit sa 30 C sakemm ma jista' jitneħħa ebda materjal ieħor.

Il-kejl tat-TER

L-impedenza tal-ġilda titkejjel bħala TER u titkejjel bl-użu ta' kurrent alternat, ta' vultaġġ baxx ta' Wheatstone databridge (13). L-ispeċifikazzjonijiet ġenerali tal-*bridge* huma vultaġġ operattiv ta' 1-3 Volt, kurrent sinus jew rettangulari alternat ta' 50 - 1 000 Hz, u firxa tal-kejl ta' mhux inqas minn 0,1 – 30 kΩ. Id-*databridge* użat fl-istudju tal-validazzjoni jkejjel l-induttanza, l-kapaċitanza u r-reżistenza sa valuri ta' 2 000 H, 2 000 μF, u 2 MΩ, rispettivament bi frekwenzi ta' 100 Hz jew 1 kHz, bl-użu ta' valuri serje jew paralleli. Għal-għanijiet tal-korrożività tat-TER il-kejl tal-figura huwa rrekordjat f reżistenza, bi frekwenzi ta' 100 Hz u bl-użu ta' valuri serje. Qabel ma titkejjel ir-reżistenza elettrika, it-tensjoni tal-wiċċ tal-ġilda titnaqqas billi jiżdied volum suffiċ jenti ta' etanol 70 % biex ikopri l-epidermis. Wara ftit sekondi, l-ethanol jitneħħa mit-tubu u mbagħad t-tessut jiġi idratat billi tiżdied taħlita ta' 3 mL $MgSO_4$ (154 mM). L-elettrodi *tad-databridge* jitqiegħdu fuq kull naħa taċ-ċirku tal-ġilda biex titkejjel ir-reżistenza f kΩ/ċirku tal-ġilda (Figura 1). Id-dimensjonijiet ta' l-elettrodi u t-tul ta' l-elettrodu espost taħt *il-crocodile clips* jintwerew fil-Figura 2. Il-molla mwaħħla ma' l-elettrodu ta' ġewwa tistrieħ fuq il-parti ta' fuq tat-tubu PTFE matul il-kejl tar-reżistenza sabiex jiġi żgurat tul konsistenti ta' l-elettrodu huwa meqrud fit-taħlita $MgSO_4$. l-elettrodu ta' barra jitqiegħed ġewwa l-parti reċettorja sabiex jistrieħ fuq il-qiegħ ta' dik il-parti. Id-distanza bejn il-molla u l-qiegħ tat-tubu PTFE tinżamm kostanti (Figura 2), għaliex din id-distanza taffettwa l-valur ta' reżistenza miksub. Għalhekk, id-distanza bejn l-elettrodu ta' ġewwa u ċ-ċirku tal-ġilda għandha tkun kostanti u minimali (1-2 mm).

Jekk il-valur tar-reżistenza mkejjel huwa akbar minn 20 kΩ, dan jista' jkun minħabba li l-fdalijiet tas-sustanza tat-test jiksu l-wiċċ eipdermali taċ-ċirku tal-ġilda. Wieħed jista' jipprova jkompli jneħħi din il-kisja, per eżempju, billi jissiġilla t-tubu PTFE bis-seba' l-kbir bl-ingwanta u mbagħad iħawdu għal madwar 10 sekondi; it-taħlita ta' $MgSO_4$ tintrema u jerġa' jsir il-kejl tar-reżistenza b' $MgSO_4$ ġdid.

Il-karatteristiċi u d-dimensjonijiet ta' l-apparat tat-test u l-proċedura ta' l-esperiment użati jistgħu jinfluwenzaw il-valuri tat-TER miksuba. Il-limitu korrożiv ta' 5 kΩ ġie żviluppat mid-data miksuba fl-apparat u l-proċdura speċifiċ i użati f dan il-Metodu. Jistgħu jgħoddu valuri differenti tal-limitu u tal-kontroll jekk jinbidlu l-kundizzjonijiet tat-test jew jintuża apparat differenti. Għalhekk, huwa meħtieġ li jiġu kkalibrati l-metodoloġija u l-valuri tal-limiti tar-reżistenza bl-ittestjar ta' serje ta' standards ta' riferenza magħżula mill-kimiċi fl-istudju tal-validazzjoni (4) (5), jew minn klassijiet tal-kimiċi li huma simili għal dawk li qed jiġu investigati. Sett ta' kimiċi ta' riferenza xierqa jintwera fit-Tabella 1.

▼B

Il-Metodi ta' l-Irbit taż-Żebgħa

L-espożizzjoni ta' xi materjali mhux korrożivi tista' tirriżulta fi tnaqqis ta' reżistenza 'l isfel mil-limitu ta' 5 kΩ li jippermetti l-mogħdija ta' joni mi ll-i*stratum corneum,* u b'hekk titnaqqas ir-reżistenza elettrika (5). Per eżempju, l-organiċi newtri u l-kimiċi li għandhom karatteristiċi attivi fil-wiċċ (inklużi deterġenti, emulsifikanti u surfattanti oħrajn) jistgħu jneħħu l-lipidi tal-ġilda li l-barrjera jagħmluha aktar permeabbli għall-joni. Għalhekk, jekk il-valuri tat-TER huma inqas minn jew madwar 5 kΩ fin-nuqqas ta' dannu viżwali, tista' ssir stima tal-penetrazzjoni taż-żebgħa fuq iċ-ċelloli tal-kontroll u dawk ittrattati sabiex jiġi determinat jekk il-valuri tat-TER miksuba kinux ir-riżultat tal-permeabilità akbar tal-ġilda, jew tal-korrożjoni tal-ġilda (3)(5). Fil-każ ta' l-aħħar fejn jinqasam l-i*stratum corneum,* iż-żebgħa sulforhodamine B, meta applikata mal-wiċċ tal-ġilda tippenetra malajr u ttebba' t-tessut ta' taħt. Din iż-żebgħa partikolari hija stabbli għal varjetà kbira ta' kimiċi u mhijiex affettwata mill-proċedura ta' l-estrazzjoni deskritta hawn taħt.

L-applikazzjoni u t-tneħħija taż-żebgħa Sulforhodamine B

Wara l-istima tat-TER, is-sulfat tal-manjeżju jintrema mit-tubu u l-ġilda tiġi eżaminata bir-retta għal dannu ovvju. Jekk ma hemm ebda dannu kbir ovvju, iż-żebħa Sulforhodamine B dye (Aċidu Aħmar 52; C.I. 45100; EINECS Numru 222-529-8; CAS numru 3520-42-1), 150 µL ta' taħ lita ta' 10 % (w/v) fl-ilma distillat tiġi applikata fuq il-wiċċ epidermali ta' kull ċirku tal-ġilda għal sagħtejn. Dawn iċ-ċrieki tal-ġilda mbagħad jinħaslu bl-ilma tal-vit sa temperatura ambjentali għal madwar 10 sekonda biex titneħħa ż-żebgħa eċċessiva/mhux użata. Kull ċirku tal-ġilda mbagħad jitneħħa bl-attenzjoni mit-tubu tal-PTFE u jitqiegħed fi flixkun (eż. flixkun tal-ħġieġ tax-xintillazzjoni ta' 20 mL) li fih ilma deionizzat (8 mL). Il-fliexken jiġu aġitati bil-mod għal 5 minuti sabiex titneħħa żebgħa żejda mhux użata. Din il-proċedura ta' tlaħliħ imbagħad hija ripetuta, u wara dan jitneħħew iċ-ċrieki tal-ġilda u jitqiegħdu fi fliexken li fihom 5 ml ta' 30 % (w/v) *sodium dodecyl sulphate* (SDS) fl-ilma distillat u huma inkubati mal-lejl f'temperatura ta' 60 ºC.

Wara l-inkubazzjoni, iċ-ċirku tal-ġilda jitneħħa u jintrema u l-bqija tat-taħlita tiġi ċċentrifugata għal 8 minuti f'temperatura ta' 21 ºC (forza relattiva ċentrifugali ~175 x g). Kampjun ta' 1 ml ta' supernatant huwa mħallat 1 f'5 (v/v) [i.e. 1 mL + 4 mL] ma' 30 % (w/v) SDS fl-ilma ddistillat. Id-densità ottika (OD) tat-taħlita titkejjel f'565 nm.

Il-kalkolu tal-kontenut taż-żebgħa

Il-kontenut ta' żebgħa sulforhodamine B għal kull ċirku huwa kkalkolat mill-valur ta' l-OD (5) (il-koeffiċjenti taż-żebgħa sulforhodamine B ta' 565 nm = 8,7 x $l0^4$; piż molekulari = 580). Il-kontenut taż-żebgħa huwa ddeterminat għal kull ċirku tal-ġilda bl-użu ta' kurva xierqa tal-kalibrazzjoni u l-kontenut medju taż-żebgħa mbagħad jiġi kkalkolati għad-doppji.

2. **ID-DATA**

Il-valuri tar-reżistenza (kΩ) u l-valuri tal-kontenut medju taż-żebgħa (µg/ċirku), fejn xieraq, għall-materjal tat-test, kif ukoll għall-kontrolli pożittivi u negattivi għandhom jiġu rrapportati f'forma ta' tabella (data individwali tal-prova u medji ± S.D.), inkluża d-data għall-esperimenti doppji/ripetuti, valuri medji u dawk individwali.

▼B

L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIZULTATI

Ir-riżultati medji tat-TER huma aċċettati jekk il-valuri tal-kontroll pożittivi u negattivi konkorrenti jaqgħu fl-iskali aċċettabbli għall-metodi fil-laboratorju tat-test. L-iskali aċċettabli tar-reżistenza għall-metodoloġija u l-apparat deskritti hawn fuq jingħataw f'din it-tabella li ġejja:

Kontroll	Sustanza	Skala tar-reżistenza (kΩ)
Pożittiv	Aċidu idrokloriku 10M	0,5 – 1,0
Negattiv	Ilma ddistillat	10 – 25

Ir-riżultati medji ta' l-irbit taż-żebgħa huma aċċettati b'kundizzjoni li l-valuri konkurrenti tal-kontroll jaqgħu fl-iskali aċċettabbli għall-metodu. Skali aċċettabbli ssuġġeriti tal-kontenut taż-żebgħa għas-sustanzi tal-kontroll għall-metodoloġija u l-apparat deskritt hawn fuq jingħataw hawn isfel:

Kontroll	Sustanza	Firxa tal-kontenut taż-żebgħa (µg/ċirku)
Pożittiv	Aċidu idrokloriku 10M	40 – 100
Negattiv	Ilma ddistillat	15 – 35

Is-sustanza tat-test jitqies mhux korrożiv għall-ġilda:

i) jekk il-valur medju tat-TER miksub għas-sustanza tat-test huwa akbar minn 5 kΩ, jew

ii) il-valur medju tat-TER huwa inqas minn jew daqs 5 kΩ, u

— iċ-ċirku tal-ġilda ma juri ebda dannu ovvju, u

— il-kontenut medju ta' żebgħa fiċ-ċirku huwa ferm inqas mill-kontenut medju ta' żebgħa fiċ-ċirku tal-kontroll pożittiv ta' l-10M HCl miksuba fl-istess ħin.

Is-sustanza tat-test titqies li hija korrożiva għall-ġilda:

i) jekk il-valur medju tat-TER miksub għas-sustanza tat-test huwa inqas minn jew daqs 5 kΩ u ċ-ċirku tal-ġilda huwa ovvjament iddanneġġjat, jew

ii) il-valur medju tat-TER huwa mean TER inqas minn jew daqs 5 kΩ, u

— iċ-ċirku tal-ġilda ma juri ebda dannu ovvju, iżda

— il-kontenut medju ta' żebgħa fiċ-ċirku huwa akbar minn jew daqs il-kontenut medju ta' żebgħa fiċ-ċirku tal-kontroll pożittiv ta' l-10M HCl miksuba fl-istess ħin.

▼B

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. Ir-RAPPORTAĠĠ TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi din l-informazzjoni li ġejja:

Is-Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll:

— l-isem/ismijiet tal-Kimika bħall-isem IUPAC jew l-isem CAS u n-numru CAS, jekk magħruf;

— is-safa u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew preparazzjoni (f perċentwali skond il-piż) u n-natura fiżika;

— il-karatteristiċi fiżiko-kimiċi bħall-istat fiżiku, pH, stabilità, solubbiltà fl-ilma, _ elevanti għat-twettiq ta' l-istudju;

— it-trattament tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk jgħodd (eż. tisħin, tħin);

— l-istabilità, jekk magħrufa.

L-annimali tat-test:

— varjetà u sess użati;

— l-età ta' l-annimali meta użati bħala annimali donaturi;

— l-għajn, il-kundizzjoni fejn jinżammu, dieta, eċċ.;

— id-dettalji tal-preparazzjoni tal-ġilda.

Il-Kundizzjonijiet tat-Test:

— il-kurvi tal-kalibrazzjoni għall-apparat tat-test;

— il-kurvi tal-kalibrazzjoni għat-twettiq tat-test għar-rabta taż-żebgħa;

— id-dettalji tal-proċedura tat-test użata biex jitkejjel it-TER;

— id-dettalji tal-proċedura tat-test użata għall-istima ta' l-irbit taż-żebgħa; jekk xieraq;

— deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċeduri tat-test;

— deskrizzjoni tal-kriterji ta' l-evalwazzjoni użati.

Riżultati:

— tabulazzjoni tad-data mit-TER u mill-valur ta' l-irbit taż-żebgħa (jekk xieraq) għall-annimali indivdiwali u għal kampjuni tal-ġilda individwali;

— deskrizzjoni ta' kwalunkwe effett osservat.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet

4. **REFERENZI**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. *in vitro* 12, 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. *in vitro* 12, 483- 524.

6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st –2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27 ta' Marzu 2002, OECD ENV/EHS, disponibbli fuq talba mis-Segretarjat

12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro:* results of an inter-laboratory trial. Toxic. *in vitro* 6, 191-194.

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

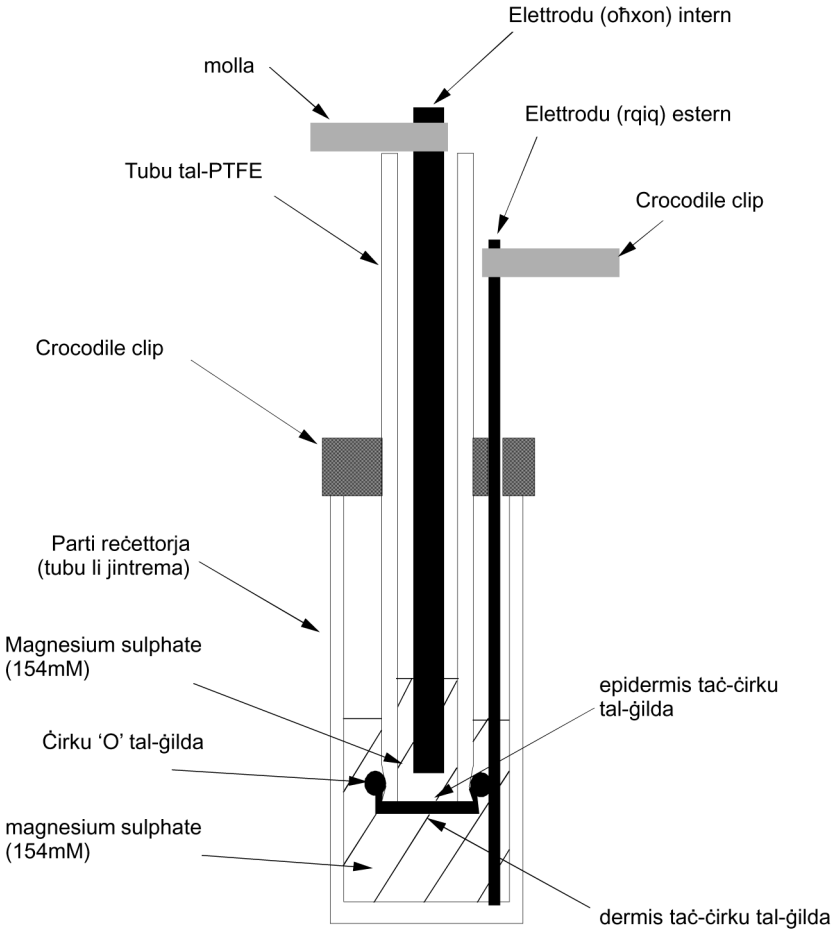
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845-852.

16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An *In vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. *in vitro*. 2, 7-17.

▼B

Figura 1

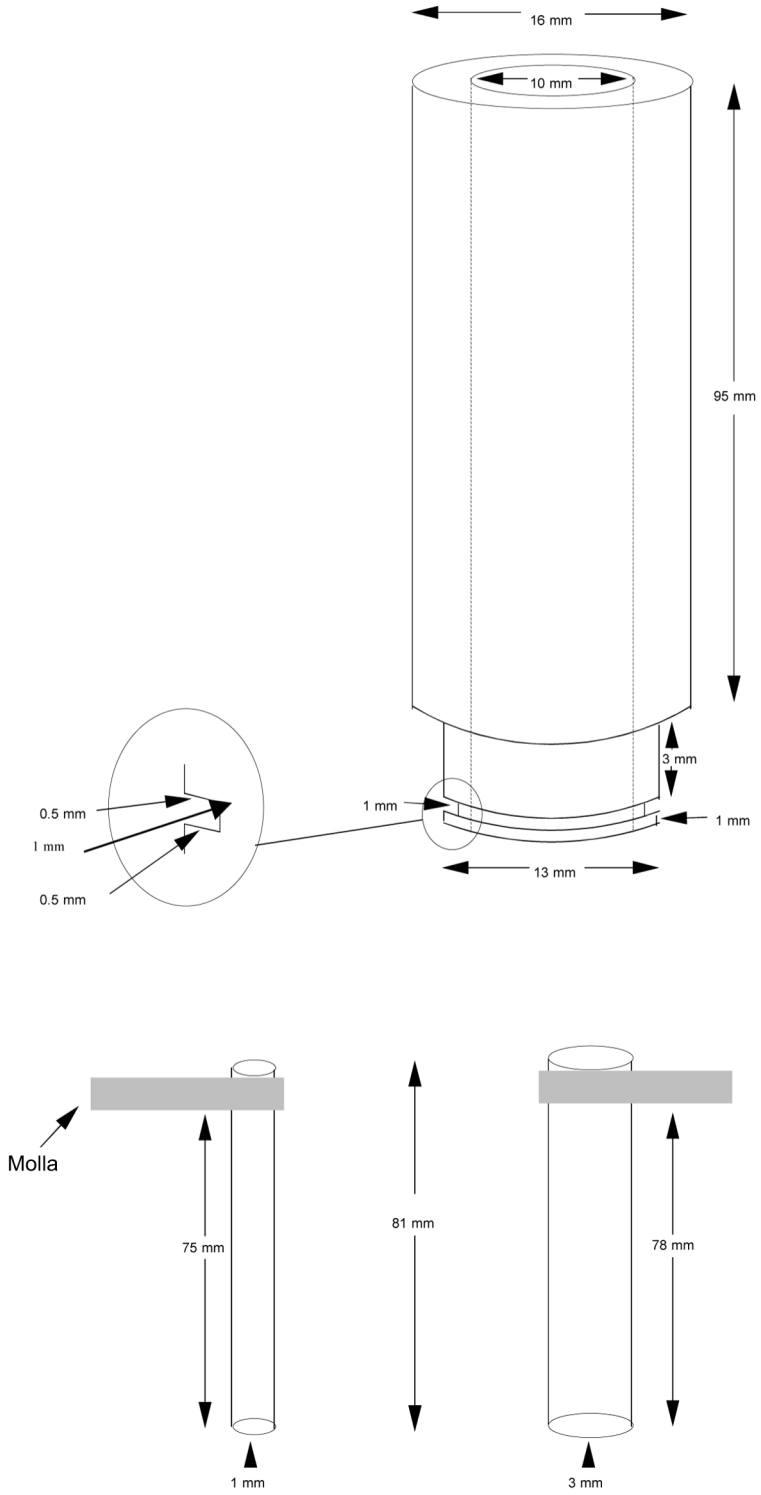
Apparat għall-figura tat-TER tal-ġilda tal-firien



▼B

Figura 2

Dimensjonijiet tat-tubu tal-polytetrafluoroethylene (PFTE) u t-tubi reċettorji u l-elettrodi użati



▼B

Il-fatturi kritiċi ta' l-apparat muri fuq:

— id-djametru ġewwieni tat-tubu tal-PTFE;

— it-tul ta' l-elettrodi relattivi għat-tubu tal-PTFE u t-tubu reċettorju, b'tali mod li ċ-ċirku tal-ġilda ma jintmessx mill-elettrodi u li tul standard ta' l-elettrodu huwa f'kuntatt mat-taħlita ta' l-$MgSO_4$;

— l-ammont tat-taħlita ta' l-$MgSO_4$ fit-tubu reċettorju għandu jagħti fond ta' likwidu, relattiv għal-livell fit-tubu tal-PFTE, kif muri fil-Figura 1;

— iċ-ċirku tal-ġilda għandu jitwaħħal tajjeb biżżejjed mat-tubu tal-PFTE, b'tali mod li r-reżistenza elettrika hija kejl beru tal-karatteristiċi tal-ġilda.

▼B

B.40.BIS. **IL-KORROŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAL-MUDELL TAL-ĠILDA UMANA**

1. **IL-METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 431 (2004).

1.1 DAĦLA

Il-korrożjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' dannu irriversibbli fit-tessut tal-ġilda wara l-applikazzjoni ta' materjal tat-test [kif definit mis-Sistema Globali Armonizzata għall-Klassifika u t-Tikkettjar ta' Sustanzi u Komposti Kimiċi (GHS – *Globally Harmonised System*)] (1). Dan il-metodu tat-test ma jeħtieġx l-użu ta' annimali ħajjin jew tessut ta' l-annimali għall-evalwazzjoni tal-korrożività tal-ġilda.

L-istima tal-korrożività tal-ġilda involviet tipikament l-użu ta' annimali tal-laboratorju (2). Ittħassib għall-uġigħ u t-tbatija involuti f'din il-proċedura ġie indirizzat fir-reviżjoni tal-Metodu tat-Test B.4 li jippermetti d-determinazzjoni tal-korrożività tal-ġilda bl-użu ta' metodi alternattivi, *in vitro,* li jevitaw l-uġigħ u t-tbatija ta' l-annimali.

L-ewwel pass biex jiġu definiti testijiet alternattivi li jistgħu jintużaw għall-ittestjar tal-korrożività tal-ġilda kien it-twettiq ta' studji tal-validazzjoni minn qabel (3). Wara dan, studju ta' validazzjoni formali ta' metodi *in vitro* biex tiġi stmata l-korrożjoni tal-ġilda (4)(5) ġie mwettaq (6)(7)(8). Ir-riżultat ta' dawn l-istudji u letteratura oħra ppubblikata wasslu għar-rakkomandazzjoni li jistgħu jintużaw dawn it-testijiet għall-istima tal-korrożività tal-ġilda *in vivo* (10)(11)12)-(13): it-test tal-mudell tal-ġilda umana (dan il-Metodu) u t-test tar-reżistenza elettrika transkutanja (ara l-Metodu tat-Test B.40).

Studji ta' validazzjoni u studji oħrajn validati rrapportaw li t-testijiet li jużaw mudelli tal-ġilda umana (3)(4)(5)(9) jsitgħu jiddiskriminaw b'mod dipendibbli bejn il-korrożivi tal-ġilda u sustanzi mhux korrożivi fuq il-ġilda. Il-protokoll tat-test jista' wkoll jipprovdi indikazzjoni tad-distinzjoni bejn korrożivi tal-ġilda severi u dawk inqas severi.

It-test deskritt f'dan il-Metodu jippermetti l-identifikazzjoni ta' sostanzi u taħlitiet kimiċi korrożivi. Jippermetti wkoll l-identifikazzjoni ta' sustanzi u taħlitiet mhux korrożivi meta tkun sostnuta mill-piż ta' determinazzjoni tal-provi bl-użu ta' informazzjoni oħra eżistenti (eż. pH, struttura-attività-relazzjonijiet, data dwar l-umani u/jew l-annimali) (1)(2)(13)(14). Normalment ma jagħtix informazzjoni xierqa dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, u lanqas ma jippermetti s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi korrożivi kif permess fis-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata (GHS) (1).

Għal evalwazzjoni sħiħa ta' l-effetti lokali fuq il-ġilda wara espożizzjoni dermali unika, huwa rakkomandat li tiġi segwita l-istrateġija tat-test sekwenzjali kif mehmuża mal-Metodu tat-Test B.4 (2) u provduta fis-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata (GHS) (1). Din l-istrateġija tat-test tinkludi t-twettiq ta' testijiet *in vitro* għall-korrożjoni tal-ġilda (kif deskritt f'dan il-metodu) u l-irritazzjoni tal-ġilda qabel ma jitqies l-ittestjar fl-annimali ħajjin.

▼B

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Il-Korrożjoni tal-ġilda *in vivo*: hija l-produzzjoni ta' dannu irriversibbli tal-ġilda: jiġifieri nekrożi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrożivi hima tipifikati minn ulċeri, ħruġ ta' demm, qxur bid-demm, u sa l-aħħar ta' l-osservazzjoni ta' 14-il jum, tnaqqis ta' kulur minħabba li tibjad il-ġilda, żoni sħaħ ta' alopecia, u ċikatriċi. Il-ħistopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

Il-vijabilità taċ-ċelloli: parametru li jkejjel l-attività totali ta' popolazzjoni ta' ċelloli (eż. l-abilità ta' mitochondrial dehidrogenases ċellolari li jnaqqsu ż-żebgħa vitali MTT), li, skond il-punt tat-tmiem imkejjel u d-diżinn tat-test użat, tikkorrelata ma' l-għadd totali u/jew il-vitalità taċ-ċelloli.

1.3 IS-SUSTANZI TA' RIFERENZA

Tabella 1

Il-Kimiċi ta' Riferenza

Isem	Nru EINECS	Nru CAS	
1,2-Diaminopropane	201-155-9	78-90-0	Korrożiv Ħafna
Aċidu Akriliku	201-177-9	79-10-7	Korrożiv Ħafna
2-tert. Butylphenol	201-807-2	88-18-6	Korrożiv
Potassium hydroxide (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrożiv
Aċidu sulfuriku (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrożiv
Aċidu Oktanoiku (aċidu kapriliku)	204-677-5	124-07-02	Korrożiv
4-Amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Mhux Korrożiv
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Mhux Korrożiv
Phenethyl bromide	203-130-8	103-63-9	Mhux Korrożiv
Tetrachloroethylene	204-825-9	27-18-4	Mhux Korrożiv
Aċidu iżosteariku	250-178-0	30399-84-9	Mhux Korrożiv
4-(Methylthio)-benzaldehyde	222-365-7	3446-89-7	Mhux Korrożiv

Il-parti l-kbira tal-kimiċi elenkati huma meħuda mil-lista ta' kimiċi magħżula għall-istudju internazzjonali ta' validazzjoni ECVAM (4). L-għażla tagħhom hija bbażata fuq dawn il-kriterji li ġejjin:

(i) numru indaqs ta' sustanzi korrożivi u mhux korrożivi;

(ii) sustanzi disponibbli kummerċjalment li jkopru l-parti l-kbira tal-klassijiet ta' kimiċi rilevanti;

(iii) l-inklużjoni ta' sustanzi korrożivi ħafna kif ukoll dawk inqas korrożivi sabiex tkun possibbli d-diskriminazzjoni bbażata fuq il-potenza korrożiva;

▼B

(iv) l-għażla tal-kimiċi li jistgħu jiġu mmaniġġjati f'laboratorju mingħajr ażżard serju minbarra l-korroživitá.

IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-materjal tat-test huwa applikat topikament fuq mudell ta' ġilda umana tri-dimensjonali li fih għall-inqas epidermis rikostruwit bi *stratum corneum* funzjonali. Il-materjali korriżivi huma identifikati mill-abilità tagħhom li jipproduċu tnaqqis fil-vijabbiltà taċ-ċelloli [kif iddeterminat, per eżempju, bl-użu tal-figura tat-tnaqqis ta' l-MTT (15)] 'l isfel minn livell ta' limitu definiti matul perjodi speċifikati ta' espożizzjoni. Il-prinċipju tal-figura tal-mudell tal-ġilda umana hija bbażata fuq il-bażi ta' l-ipoteżi li l-kimiċi korroživi jistgħu jippenetraw l-i*stratum corneum* bid-diffużjoni jew l-erożjoni, u huma ċitotossiċi fuq is-saffi ta' ċelloli ta' taħt.

Proċedura

Il-Mudelli tal-ġilda umana

Il-Mudelli tal-ġilda umana jistgħu jinbnew jew jinkisbu kummerċjalment (eż. il-mudelli EpiDerm™ u EPISKIN™) (16)(17)(18)(19) jew jistgħu jiġu żviluppati jew mibnija fil-laboratorju tat-test (20)(21). Huwa rikonoxxut li l-użu tal-ġilda umana huwa soġġett għal kunsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali. Kwalunkwe mudell ġdid għandu jiġi vvalidat (għall-inqas sal-grad deskritt taħt 1.4.1.1.2). Il-Mudelli tal-ġilda umana użati għal dan it-test għandhom ikunu konformi ma' dawn li ġejjin:

1.4.1.1.1 Il-Kundizzjonijiet tal-Mudelli Ġenerali:

Għandhom jintużaw keratinocytes umani biex jinbena l-*epithelium*. Għandhom ikunu preżenti bosta saffi ta' ċelloli epiteljali vjabbli taħt *stratum corneum* funzjonali. Il-mudell tal-ġilda jista' wkoll ikollu saff ta' komponenti stromali. L-i*stratum corneum* għandu jkollu bosta saffi bil-profil meħtieġ ta' lipidi biex jipproduċi barrjera funzjonali bir-robustezza biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida tal-li jimmarkaw ċitotossiċi. Il-karatteristiċi tal-konteniment tal-mudell għandhom jipprevjenu l-passaġġ tal-materjal madwar l-i*stratum corneum* fit-tessut vjabbli. Il-mogħdija tal-kimiċi tat-test madwar l-i*stratum corneum* twassal għall-immudellar fqir ta' l-espożizzjoni għall-ġilda. Il-mudell tal-ġilda għandu jkun ħieles mill-kontaminazzjoni bil-batterji (inkluż mikoplażma) jew fungi.

1.4.1.1.2 Il-Kundizzjonijiet tal-Mudelli Funzjonali:

Id-daqs tal-vijabbiltà normalment hija kkwantifikata bl-użu ta' MTT jew iż-żebgħat vitali oħrajn ikkonvertiti metabolikament. F'dawn il-każijiet id-densità ottika (OD – *optical density*) taż-żebgħa estratta (solubilizzata) mit-tessut tal-kontroll negattiv għandha tkun għall-inqas 20 drabi akbar mill-OD tas-solvent ta' l-estrazzjoni waħdu [għal perspettiva ġenerali ara (22)]. It-tessut tal-kontroll negattiv għandu jkun stabbli fil-kultura (jipprovdi kejl simili ta' vijabbiltà) għal kemm idum il-perjodu ta' l-espożizzjoni tat-test. L-i*stratum corneum* għandu jkun robust biżżejjed biex jirreżisti l-penetrazzjoni mgħaġġla ta' xi kimiċi li jimmarkaw ċitotossiċi (eż. 1 % Triton X-100). Din il-karatteristika tista' tiġi stmata bil-ħin ta' l-espożizzjoni meħtieġ biex il-viajbbiltà taċ-ċelloli tonqos b'50 % (ET_{50}) (eż. għall-mudelli EpiDerm™ u EPISKIN™ dan huwa > sagħtejn). It-tessut għandu juri r-reproduttività maż-żmien u preferibbilment bejn il-laboratorji. Barra minn dan għandhom ikunu jistgħu jipprevedu l-potenzjal korroživ tal-kimiċi ta' riferenza (ara t-Tabella 1) meta użati fil-protokoll tat-test magħżul.

▼B

L-applikazzjoni tat-test u s-sustanzi tal-kontroll

Żewġ replikati tat-tessut jintużaw għal kull trattament (ħin ta' l-espożizzjoni), inklużi l-kontrolli. Għall-materjali likwidi, għandha tkun applikata biżżejjed sustanza tat-test biex tkopri l-wiċċ tat-test b'mod uniformi: għadu jintuża mhux inqas minn 25 μL/cm^2. Għall-materjali solidi, għandha tiġi applikata biżżejjed sustanza tat-test biex tkopri l-ġilda b'mod indaqs, u għandha tiġi umdata b'ilma deonizzat jew distillat biex jiġi żgurat kuntatt tajjeb mal-ġilda. Fejn xieraq, is-solidi għandhom jiġu mitħuna għal terra qabel l-applikazzjoni. Il-metodu ta' l-applikazzjoni għandu jkun xieraq għas-sustanza tat-test (ara eż. r-referenza 5). Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, il-materjal tat-test għandu jiġi maħsul bir-reqqa mill-wiċċ tal-ġilda b'*buffer* xieraq, jew 0,9 % NaCl.

Għandhom jintużaw kontrolli konkurrenti pożittivi u negattivi għal kull studju biex tiġi żgurata l-ħidma xierqa tal-mudell esperimentali. Is-sustanzi tal-kontroll ppożittiv suġġeriti huma l-aċidu aċetiku glaċjali jew 8N KOH. Il-kontrolli negattivi suġġeriti huma 0,9 % NaCl jew ilma.

Il-kejl tal-vijabbiltà taċ-ċelloli

Jistgħu jintużaw biss mudelli kwantitattivi, validati biex titkejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli. Barra minn dan, il-miżura tal-vijabbiltà għandha tkun kompatibbli ma' l-użu f'kostruzzjoni ta' tessut tri-dimensjonali. L-irbit taż-żebgħa mhux speċifiku m'għandux jinterferixxi mal-kejl tal-vijabbiltà. Iż-żebgħa ta' l-irbit tal-proteini u dawk li ma jgħaddux minn konverżjoni metabolika (eż. l-aħmar newtrali) għalhekk mhumiex xierqa. Il-figura li tintuża l-aktar spiss hija t-tnaqqis MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue: EINECS numru 206-069-5, CAS numru 298-93-1)], li ntwera li jagħti riżultati preċiżi u riproduċibbli (5) iżda jistgħu jintużaw oħrajn. Il-kampjun tal-ġilda jitqiegħed f'taħlita ta' MTT ta' konċentrazzjoni (eż. 0,3-1 mg/mL) f'temperatura ta' inkubazzjoni xierqa għal 3 sigħat. Il-prodott blu preċipitat ta' formazan imbagħad huwa estratt bl-użu ta' solvent (isopropanol), u l-konċentrazzjoni tal-formazan hija mkejla b'determinazzjoni ta' l-OD f'*wavelength* bejn 540 u 595 nm.

L-azzjoni kimika bil-materjal tat-test fuq iż-żebgħa vitali tista' timita dik tal-metaboliżmu ċellolari li jwassal għal stima falza tal-vijabbiltà. Dan intwera li jsir meta dan il-materjal tat-test mhuwiex imneħħi għal kollox mill-ġilda bit-tlaħliħ (9). Jekk il-materjal tat-test jaġixxi direttament fuq iż-żebgħa vitali, għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex issir skoperta u korrezzjoni għall-interferenza tas-sustanzi tat-test mal-kejl tal-vijabbiltà (9)(23).

2. **DATA**

Għal kull tessut, il-valuri OD u d-data dwar il-perċentwali kkalkolati tal-vjabbiltà taċ-ċelloli għall-materjal tat-test, il-kontrolli pożittivi u dawk negattivi għandhom ikunu rrapportati f'tabella, inkluża d-data minn esperimenti ripetuti tar-repliċi kif xieraq, valuri medji u individwali.

▼B

L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIZULTATI

Il-valuri ta' l-OD miksuba għal kull kampjun tat-test jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-perċentwal tal-vijabbiltà relattiva għall-kontroll negattiv, li hija stabbilita arbitrarjament bħala 100 %. Il-limitu tal-perċentwal tal-vjabbiltà taċ-ċelloli li jiddistingwi l-materjali tat-test korrożivi u dawk mhux korrożivi (jew li jiddiskriminaw bejn il-klassijiet differenti, korrożivi), jew il-proċedura/i statistikali għall-evalwazzjoni tar-riżultati u l-identifikazzjoni tal-materjali korrożivi, għandhom jiġu definiti b'mod ċar u ddokumentati, u għandhom jintwerew li huma xierqa. B'mod ġenerali dawn il-valuri limiti huma stabbiliti waqt l-ottimizzazzjoni tat-test, ittestjati waqt fażi ta' validazzjoni qabel, u kkonfermati fi studju ta' validazzjoni. Bħala eżempju, it-tbassir tal-Korrożività assoċjata mal-mudell EpiDerm™ huwa (9):

Is-sustanza tat-test titqies li hija korrożiva għall-ġilda:

(i) jekk il-vijabbiltà wara espożizzjoni ta' 3 minuti hija inqas minn 50 %, jew

(ii) jekk il-vijabbiltà wara espożizzjoni ta' 3 minuti hija akbar minn jew daqs 50 % u l-vjabbiltà wara espożizzjoni ta' sieġħa hija inqas minn 15 %.

Is-sustanza tat-test titqies li hija mhux korrożiva għall-ġilda:

(i) jekk il-vijabbiltà wara espożizzjoni ta' 3 minuti hija akbar minn jew daqs 50 % u l-vjabbiltà wara espożizzjoni ta' sieġħa hija akbar minn jew daqs 15 %.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORTAĠĠ TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi din l-informazzjoni li ġejja:

Is-Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll:

— l-isem/ismijiet tal-Kimika bħall-isem IUPAC jew l-isem CAS u l-CAS numru, jekk magħruf;

— is-safa u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew preparazzjoni (f'perċentwali skond il-piż);

— il-karatteristiċi fiżiko-kimiċi bħall-istat fiżiku, pH, stabilità, solubbiltà fl-ilma, relevanti għat-twettiq ta' l-istudju;

— it-trattament tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk jgħodd (eż. tisħin, ħin);

— l-istabilità, jekk magħrufa;

Il-ġustifikazzjoni tal-mudell tal-ġilda u l-protokoll użati.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— is-sistema taċ-ċelloli użata;

— l-informazzjoni tal-kalibrazzjoni għall-apparat tal-kejl użat biex titkejjel il-vjabbiltà taċ-ċelloli (eż. Spettrofotometru);

▼B

— informazzjoni sħiħa ta' appoġġ għall-mudell speċifiku tal-ġilda użata inkluż il-validità tagħha;

— id-dettalji tal-proċedura tat-test użata;

— id-dożi tat-test użati;

— deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċeduri tat-test;

— referenza għad-data storika tal-mudell;

— deskrizzjoni tal-kriterji ta' l-evalwazzjoni użati.

Riżultati:

— tabulazzjoni tad-data mill-kampjuni individwali tat-test;

— deskrizzjoni ta' kwalunkwe effett osservat.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjoni.

4. **REFERENZI**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23,219-255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. *In vitro* 12, 471-482.

5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. *In vitro* 12, 483-524.

6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp.371-401.

10. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

11. ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st –2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, disponibbli fuq talba mis-Segretarjat

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

15. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55-63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. *In vitro* 8, 889-891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211-225.

18. Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis *in vitro*. In *In vitro* Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140

19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). *In vitro* and post –transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310-319

20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.

21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69-84.

23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVItro 15, 57-93.

▼B

B.41. IT-TEST TAL-FOTOTOSSIĊITÀ *IN VITRO* 3T3 NRU

1. METODU

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 432 (2004).

1.1. DAĦLA

Il-fototossiċità hija definita bħala reazzjoni tossika minn sustanza applikata fuq il-ġisem li hija miġbuda jew miżjuda (apparenti f'livelli ta' dożi aktar baxxi) wara l-espożizzjoni sussegwenti għad-dawl, jew li hija indotta mill-irradjazzjoni tal-ġilda wara amministrazzjoni sistemika ta' sustanza.

It-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU jintuża biex jiġi identifikat il-potenzjal fototossiku ta' sustanza tat-test indotta mill-kimika eċċitata wara l-espożizzjoni għad-dawl. It-test jevalwa l-foto-ċitotossiċità bit-tnaqqis relattiv fil-vijabbiltà taċ-ċelloli esposti għall-kimika fil-preżenza kontra n-nuqqas tad-dawl. Is-sustanzi identifikati minn dan it-test x'aktarx ikunu fototossiċi *in vivo* wara applikazzjoni sistemika u tixrid mal-ġilda, jew wara applikazzjoni topikali.

Bosta tipi ta' kimiċi ġew irrapportati li jinduċu l-effetti fototossiċi (1)(2)(3)(4). Il-karatteristika komuni tagħhom hija l-abilità tagħhom li jassorbu l-enerġija tad-dawl fil-firxa tad-dawl tax-xemx. Skond l-ewwel liġi tal-fotokimika (il-Liġi ta' Grotthaus-Draper), il-fotoreazzjoni teħtieġ assorbiment suffiċjenti ta' ammonti ta' dawl. Għalhekk qabel ma jitqies l-ittestjar bioloġiku, spettru ta' l-assorbiment UV/vis tal-kimika tat-test għandu jiġi ddeterminat skond il-Linja Gwida tat-Test 101 ta' l-OECD. Ġie ssuġġerit li jekk il-koeffiċjent ta' l-estinzjoni/assorbiment molari huwa inqas minn 10 litru x mol-1 x cm-1 x'aktarx li l-kimika mhijiex fotoreattiva. Din il-kimika tista' ma teħtieġx li tiġi ttestjata fit-test *in vitro* 3T3 NRU tal-fototossiċità jew kwalunkwe test ieħor bioloġiku għall-effetti avversi fotokimiċi (1)(5). Ara wkoll l-Anness 1.

L-affidabbiltà u r-rilevanza tat-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU ġew evalwati dan laħħar (6)(7)(8) (9). It-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU intwera li jbassar l-effetti ta' fototossiċità akuta fl-annimali u fl-umani *in vivo*. It-test mhuwiex diżinjat li jbassar effetti avversi oħrajn li jistgħu jirriżultaw minn azzjoni kkombinata ta' kimika u d-dawl, eż. ma jindirizzax il-fotoġenotossiċità, il-fotoallerġija, jew il-fotokarċinoġeniċità, u lanqas ma jippermetti stima tas-saħħa tal-fototossiċità. Barra minn dan, it-test ma ġiex diżinjat li jindirizza l-mekkaniżmi indiretti tal-fototossiċità, l-effetti tal-metaboliti tas-sustanza tat-test, jew l-effetti tat-taħlitiet.

Billi l-użu tas-sistemi metabolizzanti huwa rekwiżit ġenerali għat-testijiet kollha *in vitro* għall-basra ta' potenzjal ġenotossiku jew karċinoġeniku, s'issa, fil-każ tal-fototossikoloġija, hemm biss eżempji rari fejn it-trasformazzjoni metabolika hija meħtieġa biex il-kimika taġixxi bħala fototissinu *in vivo* jew *in vitro*. Għalhekk, la jitqies meħtieġ u lanqas xjentifikament ġustifikat li dan it-test isir b'sistema ta' attivazzjoni metabolika.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Irradjanza: fl-intensità ta' inċident tad-dawl ultravjola (UV) jew ta' dawl viżibbli fuq wiċċ, imkejjel f'W/m^2 or mW/cm^2.

Doża ta' dawl: il-kwantità (= intensità × ħin) ta' radjazzjoni ultravjola (UV) jew viżibbli fuq wiċċ, espresso f'Joules (= W × s) għal kull arja tal-wiċċ, eż. J/m^2 jew J/cm^2.

Wavebands tad-Dawl UV: l-indikazzjonijiet rakkomandati mis-CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) huma: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) u UVC (100-280 nm). Indikazzjonijiet oħrajn jintużaw ukoll; id-diviżjoni bejn UVB u UVA spiss titqiegħed bħala 320 nm, u l-UVA tista' tinqasam f'UV-A1 u UV-A2 u jsir qsim f'madwar 340 nm.

Il-vijabilità taċ-ċelloli: parametru li jkejjel l-attività totali ta' popolazzjoni ta' ċelloli (eż. l-użu taż-żebħa vitali Aħmar Newtrali fil-liżożomi ċellulari), li, skond il-punt tat-tmiem imkejjel u d-diżinn tat-test użat, tikkorrelata ma' l-għadd totali u/jew il-vitalità taċ-ċelloli.

Il-vijabilità taċ-ċelloli relattiva: il-vijabilità taċ-ċelloli espressa b'relazzjoni mal-kontrolli solventi (negattivi) li ntużaw fil-proċedura sħiħa tat-test (jew +Irr jew -Irr) iżda mhux ittrattati bil-kimika tat-test.

PIF (*Photo-Irritation-Factor* – Fattur tal-Foto-Irritazzjoni): fattur iġġenerat bit-tqabbil ta' żewġ konċentrazzjonijiet effettivi ndaqs (IC_{50}) tal-kimika tat-test miksuba fin-nuqqas (-Irr) u fil-preżenza (+Irr) ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika b'dawl UVA/vis.

IC_{50}: il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test li biha l-vijabilità taċ-ċelloli titnaqqas b'50 %.

MPE (*Mean-Photo-Effect* – Foto-Effett-Medju): kejl derivat mill-analiżi matematika tal-kurvi tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni miksuba fin-nuqqas (-Irr) u fil-preżenza (+Irr) ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika bid-dawk UVA/vis.

Fototossiċità: reazzjoni tossika akuta li hija eliċitata wara l-ewwel espożizzjoni tal-ġilda ma' xi kimika u l-espożizzjoni sussegwenti għad-dawl, jew li hija indotta b'mod simili mill-irradjazzjoni tal-ġilda wara l-amministrazzjoni sistemika ta' kimika.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU huwa bbażat fuq paragun taċ-ċitotossiċità ta' kimika meta tiġi ttestjata fil-preżenza u fin-nuqqas ta' espożizzjoni għal doża mhux ċitotossika ta' dawl tax-xemx simulata. Iċ-ċitotossiċità f'dan it-test hija espressa bħal tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni ta' l-użu taż-żebgħa vitali Aħmar Newtrali meta mkejjel 24 siegħa wara t-trattament bil-kimika tat-test u l-irradjazzjoni (10). L-Aħmar Newtrali huwa żebgħa katjonika dgħajfa li tippenetra t-tessut taċ-ċelloli malajr bin-nuqqas ta' diffiżjoni, u takkumula b'mod interċellolari fil-liżożomi. L-alterazzjonijiet tal-wiċċ tat-tessut sensittiv liżożomali jwasslu għall-fraġilità liżożomali u tibdil ieħor li gradwalment isiru irriversibbli. Dan it-tibdil ikkaġunat mill-azzjoni tax-xenobjotiċi jirriżulta f'użu u rbit mnaqqsa ta' l-Aħmar Newtrali. Għalhekk huwa possibbli li ssir distinzjoni bejn iċ-ċelloli vijabbli, dawk danneġġjati u dawk mejtin, li huwa l-bażi ta' dan it-test.

▼B

Iċ-ċelloli Balb/c 3T3 jinżammu f'kultura għal 24 siegħa għall-formazzjoni ta' monosaffi. Imbagħad żewġ plattini 96-well għal kull kimika tat-test jiġi pre-inkubati bi tmien konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test għal siegħa. Wara dan, waħda miż-żewġ plattini hija esposta għall-ogħla doża ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika filwaqt li l-plattina l-oħra tinżamm fid-dlam. Fiż-żewġ plattini il-mezz tat-trattament huwa sostitwit mill-mezz tal-kultura u wara 24 siegħa oħra ta' inkubazzjoni, il-vijabilità taċ-ċelloli hija ddeterminata bl-użu ta' l-Aħmar Newtrali. Il-vijabilità taċ-ċelloli hija espressa bħala persentaġġ tal-kontrolli tas-solvent mhux ittrattati u hija kkalkolata għal kull konċentrazzjoni tat-test. Biex jitbassar il-potenzjal fototossiku, ir-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni huma mqabbla, normalment fil-livell ta' l-IC_{50}, jiġifieri l-konċentrazzjoni li tnaqqas il-vijabilità taċ-ċelloli għal 50 % meta mqabbel mal-kontrolli mhux ittrattati.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **Il-preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Iċ-ċelloli*

Linja permanenti tal-fibroblast taċ-ċelloli tal-ġrieden, Balb/c 3T3, klonu 31, jew mill-American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, Stati Uniti, jew mill-European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Renju Unit, intużat fl-istudju tal-validazzjoni, u għalhekk huwa rakkomandat il-ksib minn depożitarju taċ-ċelloli kkwalifikat sew. Ċelloli jew linji taċ-ċelloli oħrajn jistgħu jintużaw bl-istess proċedura tat-test jekk il-kundizzjonijiet tal-kultura huma adattati għall-bżonnijiet speċifiċi taċ-ċelloli, iżda l-ekwivalenza għandha tintwera.

Iċ-ċelloli għandhom jiġu ċċekkjati b'mod regolari għan-nuqqas tal-kontaminazzjoni tal-mikoplażma u jintużaw biss jekk ma tinstabx kontaminazzjoni (11).

Huwa importanti li s-sensittività għall-UV taċ-ċelloli hija vverifikata b'mod regolari skond il-proċedura tal-kontroll tal-kwalità deskritta f'dan il-metodu. Minħabba li s-sensittività taċ-ċelloli għall-UVA tista' tiżdied bin-numru ta' passaġġi, għandhom jintużaw ċelloli Balb/c 3T3 tan-numru l-aktar baxx ta' passaġġi possibbli li jista' jinkiseb, preferibbilment inqas minn 100 (ara t-taqsima 1.4.2.2.2 u l-Anness 2).

1.4.1.2. *Il-kundizzjonijiet tal-mezzi u tal-kultura*

Għandhom jintużaw mezzi tal-kultura u kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni xierqa għall-passaġġ rutin taċ-ċelloli u matul il-proċedura tat-test, eż. għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 dawn huma DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplimentati b'10 % seru ta' l-għoġol għadu jitwieled, 4 mM glutamina, peniċillina (100 IU), u *streptomycin* (100 µg/mL), u inkubazzjoni umidifikata f'temperatura ta' 37 ºC, 5-7,5 % CO_2 skond il-*buffer* (ara t-taqsima 1.4.1.4, tieni paragrafu.). Huwa ta' importanza partikolari li l-kundizzjonijiet tal-kultura taċ-ċelloli jiżguraw ħin taċ-ċiklu taċ-ċelloli fil-firxa normali storika taċ-ċelloli jew tal-linja taċ-ċelloli użati.

1.4.1.3. *Il-preparazzjoni tal-kulturi*

Iċ-ċelloli minn kulturi ta' ħażniet iffriżati huma miżrugħa f'mezz tal-kultura ta' densità approssimata u subkulturati għall-inqas darba qabel ma jintużaw fit-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU.

▼B

Iċ-ċelloli użati għat-test tal-fototossiċità jinżergħu fid-densitàż xierqa sabiex il-kulturi ma jilħqux konfluwenza sa l-aħħar tat-test, jiġifieri meta l-vijabilità hija ddeterminata 48 siegħa wara ż-żriegħ taċ-ċelloli. Għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 imkabbra fi plattini 96-well, id-densità rrakkomandata taż-żriegħ taċ-ċelloli hija ta' 1 x 10^4 ċelloli għal kull well.

Għal kull test iċ-ċelloli kimiċi jiġu miżrugħa b'mod identiku f'żewġ plattini separati 96-well, li mbagħad jitgħaddew b'mod konkorrenti mill-proċedura sħiħa tat-test taħt kundizzjonijiet ta' kultura identiċi ħlief għat-terminu sħiħ meta waħda mill-plattini tiġi irradjata (+Irr) u l-oħra tinżamm fid-dlam (-Irr).

1.4.1.4. *Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test*

Is-sustanzi tat-test għandhom jiġu ppreparati friski, immedjatament qabel l-użu kemm-il darba d-data ma turix l-istabilità tagħhom meta huma maħżuna. Huwa rrakkomandat li l-immaniġġjar kimiku kollu u t-trattament inizzjali taċ-ċelloli jsiru taħt kundizzjonijiet tad-dawl li jevitaw il-fotoattivazzjoni jew id-degradazzjoni tas-sustanza tat-test qabel l-irradjazzjoni.

Il-kimiċi tat-test għandhom jinħallu f'taħlitiet ta' mluħ *buffered*, eż. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), jew taħlitiet *buffer* oħrajn fiżjoloġikament ibbilanċjati, li għandhom ikunu ħelsin minn komponenti ta' proteini, komponenti li jassorbu d-dawl (eż. kuluri li jindikaw il-pH u vitamini) sabiex tiġi evitata l-interferenza matul l-irradjazzjoni. Ladarba matul l-irradjazzjoni ċ-ċelloli jinżammu għal madwar 50 minuta barra mill-inkubatur ta' CO_2, għandu jkun hemm attenzjoni li tiġi evitata l-alkalizzazzjoni. Jekk jintużaw *buffers* dgħajfin bħall-EBSS dan jista' jinkiseb billi ċ- ċelloli jiġu inkubati f'7,5 % CO_2. Jekk iċ-ċelloli jiġu inkubati f'5 % CO_2 biss, għandu jingħażel *buffer* aktar qawwi.

Il-kimiċi tat-test ta' solubbiltà limitata fl-ilma għandhom jinħallu f'solvent xieraq. Jekk jintuża solvent, dan għandu jkun preżenti f'volum kostanti fil-kulturi kollha, jiġifieri fil-kontrolli negattivi (solventi) kif ukoll fil-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test, u għandhom ikunu mhux ċitotossiċi f'dik il-konċentrazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test għandhom jingħażlu sabiex jiġu evitati taħlitiet preċipitati jew imsaħħbin.

Dimethylsulphoxide (DMSO) u l-etanol (ETOH) huma s-solventi rrakkomandati. Jistgħu jkunu xierqa solventi oħrajn ta' ċitotossiċità baxxa. Qabel ma jintużaw, is-solventi kollha għandhom jiġu stmati għal karatteristiċi xierqa, eż. reazzjoni mal-kimika tat-test, tnaqqis ta' l-effett fototossiku, proprjetajiet *scavenging* radikali u/jew stabilità kimika fis-solvent.

It-taħlit fil-vortiċi u/jew is-sonikazzjoni u/jew it-tisħin sa temperatura xierqa jistgħu jintużaw biex tiġu mgħejuna s-solubilazzjoni kemm-il darba dan ma jaffettwax l-istabilità tal-kimika tat-test.

▼B

1.4.1.5. *Il-Kundizzjonijiet ta' l-Irradjazzjoni*

1.4.1.5.1. L-għajn tad-dawl

L-għażla ta' għajn xieraq u ta' filtri tad-dawl huwa fattur kruċjali fl-ittestjar tal-fototossiċità. Id-dawl ta' l-UVA u tar-reġjuni viżibbli normalment huwa normalment assoċjat mar-reazzjonijiet fototossiċi *in vivo* (3)(12), filwaqt li ġeneralment il-UVB huwa inqas rilevanti iżda huwa ċitotossiku ħafna; iċ-ċitotossiċità tiżdied 1 000-darba għaliex il-*wavelength* jinbidel minn 313 għal 280 nm (13). Il-kriterji għall-għażla ta' l-għajn tad-dawl xieraq għandhom jinklużu r-rekwiżit li l-għajd tad-dawl jagħti *wavelengths* assorbiti mill-kimika tat-test (spettru ta' l-assorbiment) u li d-doża tad-dawl (li tista' tinkiseb f'ħin ta' espożizzjoni raġonevoli) għandha tkun suffiċjenti biex jinżammu l-kimiċi magħrufin li huma fotoċitotossiċi. Barra minn dan, il-*wavelengths* u d-dożi m'għandhomx ikunu ta' ħsara żejda għas-sistema tat-test, eż. l-emissjoni tas-sħana (ir-reġjun ta' l-infra-aħmar).

Is-simulazzjoni tad-dawl tax-xemx bis-simulaturi tax-xemx titqies li hija l-għajn ta' dawl artifiċjali ottimali. Id-distribuzzjoni ta' l-enerġija ta' l-irradjazzjoni tas-simulatur tax-xemx iffiltrat għandha tkun qrib dik tad-dawl tal-ġurnata barra mogħtija f'(14). Kemm l-arki ta' Xenon u arki ta' alid ta' merkurju-metall *(doped)* jintużaw bħala simulaturi tax-xemx (15). Ta' l-aħħar għandu l-vantaġġ li jagħti inqas sħana u huwa irħas, iżda kemm jaqbel mad-dawl tax-xemx huwa inqas perfett meta mqabbel ma' dak ta' l-arki tax-xenon. Minħabba li s-simulaturi kollha tax-xemx jagħtu kwantitajiet ta' UVB sinjifikanti għandhom ikunu ffiltrati biex inaqqasu l- *wavelengths* ta l-UVB li huma ċitotossiċi ħafna. Minħabba li l-materjali tal-plastik tal-kultura taċ-ċelloli fihom stabbilizzanti tal-UV l-ispettru għandu jiġi mkejjel bl-istess tip ta' għatu tal-plattina ta' 96-well li se jintuża fl-analiżi. Irrispettivament mill-miżuri meħuda biex partijiet mill-ispettru jiġu mnaqqsa bl-iffiltrar jew b'effetti inevitabbli ta' filtru tat-tagħmir, l-ispettru rrekordjat 'l isfel minn dawn il-filtri m'għandhomx jiddevjaw mid-dawl tal-ġurnata barra standardizzat (14). Eżempju tad-distribuzzjoni ta' l-irradjanza spettrali tas-simulatur tax-xemx iffiltrat użat fl-istudju tal-validazzjoni tat-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU jingħata f'(8)(16). Ara wkoll l-Anness 2 Figura 1.

1.4.1.5.2 Id-Dożimetrija

L-intensità tad-dawl (irradjanza) għandha tiġi ċċekkjata b'mod regolari qabel kull test tal-fototossiċità bl-użu ta' miter ta' l-UV xieraq tal-broadband. L-intensità għandha titkejjel bl-istess tip ta' għatu tal-plattina ta' 96-well li se jintuża fl-analiżi. Il-miter ta' l-UV għandu jkun ġie kkalibrat għall-għajn. Il-ħidma tal-miter ta' l-UV għandha tiġi ċċekkjata, u għal dan l-għan l-użu ta' miter ta' l-UV ieħor, ta' riferenza, ta' l-istess tip u ta' kalibrazzjoni identika huwa rrakkomandat. Idealment, f'intervalli akbar, għandu jintuża spettroradjometru biex titkejjel l-irradjanza spettrali ta' l-għajn tad-dawl iffiltrat u biex tiġi ċċekkjata l-kalibrazzjoni tal-miter ta' l-UV tal-broadband.

Doża ta' 5 J/cm^2 (kif imkejjel fil-firxa ta' l-UVA) ġiet determinata li mhijiex ċitotossika għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 u li hija qawwija biżżejjet biex teċċita lill-kimiċi biex jeliċitaw reazzjonijiet fototossiċi, (6) (17) eż. biex jinkiseb 5 J/cm^2 f'perjodu ta' żmien ta' 50 min, l-irradjanza ġiet aġġustata għal 1,7 mW/cm^2. Ara l-Anness 2 Figura 2. Jekk tintuża linja oħra ta' ċelloli jew għajn ta' dawl differenti, id-doża ta' l-irradjazzjoni tista' tkun trid tiġi kkalibrata sabiex jista' jingħażel reġimen tad-doża li ma jagħmilx ħsara liċ-ċelloli iżda li hija biżżejjed biex teċċita fototossini standard. Il-ħin ta' l-espożizzjoni għad-dawk huwa kkalkolat b'dan il-mod:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{Doża ta irradjazzjoni } (J \,/\, cm^2) \times 1000}{\text{irradjanza } (mW \,/\, cm^2) \times 60} \quad (1J = 1\ \text{Wsec})$$

1.4.2 **Il-kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1 *Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test*

Il-firxiet tal-konċentrazzjonijiet ta' kimika ttestjata fil-preżenza (+Irr) u fin-nuqqas (-Irr) tad-dawl għandhom jiġu ddeterminati b'mod xieraq f'analiżijiet tas-sejba tal-firxa tad-doża. Jista' jkun utli li s-solubbiltà tiġi smtata fil-bidu u fis-60 min (jew kwalunkwe ħin ta' trattament huwa meħtieġ), għaliex is-solubbiltà tista' tinbidel maż-żmien jew matul l-espożizzjoni. Biex tiġi evitata t-tossiċità indotta minn kundizzjonijiet ta' kultura mhux xierqa jew minn kimiċi ta' aċidità jew alkalinità għolja, il-pH tal-kulturi taċ-ċelloli biż-żjieda tal-kimika tat-test għandu jkun fil-firxa 6,5 – 7,8.

L-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun ġewwa l-kundizzjonijiet fiżjoloġiċi tat-test, eż. għandhom jiġu evitati l-istress ożmotiku u dak tal-pH. Skond il-kimika tat-test, jista' jkun meħtieġ li jitqiesu karatteristiċi oħrajn fiżiċi-kimiċi bħala fatturi li jillimitaw logħla konċentrazzjoni tat-test. Għal sustanzi relattivament insolubbli li mhumiex tossiċi f'konċentrazzjonijiet sal-punt tas-saturazzjoni, l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb għandha tiġi ttestjata. B'mod ġenerali, il-preċipitazzjoni tal-kimika tat-test fi kwalunkwe mill-konċentrazzjonijiet tat-test għandha tiġi evitata. Il-konċentrazzjoni massima ta' sustanza tat-test m'għandhiex teċċedi 1 000 μg/mL; l-ożmolarità m'għandhiex teċċedi 10 mmolar. Għandu jintuża serje ta' taħlit ġeometriku ta' 8 konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test b'fattur kostanti tat-taħlit (ara t-taqsima 2.1, tieni paragrafu).

Jekk hemm informazzjoni (minn esperiment għas-sejba tal-firxiet) li l-kimika tat-test mhijiex ċitotossika sal-konċentrazzjoni tal-limitu fl-esperiment fid-dlam (-Irr), iżda hija ċitotossika ħafna meta tiġi irradjata (+Irr), il-firxiet tal-konċentrazzjoni li għandhom jingħażlu għall-esperiment jistgħu jkunu differenti minn dawk magħżula għall-esperiment (–Irr) biex jintlaħaq ir-rekwiżit tal-kwalità xierqa tad-data.

1.4.2.2 *Il-Kontrolli*

1.4.2.2.1 Is-sensittività għar-radjazzjoni taċ-ċelloli, l-istabbiliment tad-data storika:

Iċ-ċelloli għandhom jiġu ċċekkjati regolarment (madwar kull ħames passaġġ) għal sensittività għall-għajn tad-dawl billi tiġi stmata l-vijabbiltà tagħhom wara espożizzjoni għal doża akbar ta' l-irradjazzjoni. Bosta doża ta' irradjazzjoni, inklużi livelli sostanzjalment ogħla minn dawk użati għat-test tal-Fototossiċità 3T3 NRU għandhom jintużaw f'din l-istima. Dawn id-doża huma kkwantitati bil-mod l-aktar faċli bil-kejl tal-partijiet UV ta' l-għajn tad-dawl. Iċ-ċelloli jiġu miżrugħa bid-densità użata fit-test tal-fototissiċità *in vitro* 3T3 NRU u irradjati l-għada. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli mbagħad tiġi ddeterminata jum wara permezz ta' l-użu ta' l-Aħmar Newtrali. Għandu jintwera li l-ogħla doża riżultanti li mhijiex ċitotossika (eż. fl-istudju tal-validazzjoni: 5 J/cm^2 [UVA]) kienet biżżejjed biex il-materjali ta' riferenza (Tabella 1) jiġu kklassifikati tajjeb.

▼B

1.4.2.2.2 Is-sensittività għar-radjazzjoni, l-iċċekkjar tat-test kurrenti:

It-test jilħaq il-kriterji ta' kwalità jekk il-kontrolli irradjati negattivi/-solventi juru vijabbiltà ta' aktar minn 80 % meta mqabbel ma negattivi/solventi mhux irradjati.

1.4.2.2.3 Il-vijabbiltà tal-kontrolli solventi

Id-densità ottika assoluta ($OD_{540\ NRU}$) ta' l-Aħmar Newtrali estratt mill-kontrolli tas-solventi jindika jekk il-1×10^4 ċelloli miżrugħa f'kull well kibrux b'ħin ta' l-irduppjar normali matul il-jumejn ta' l-analiżi. Test jilħaq il-kriterji ta' l-aċċettazzjoni jekk l-$OD_{540\ NRU}$ medju tal-kontrolli mhux ittrattati huwa $\geq$ 0,4 (jiġifieri madwar għoxrin darba daqs l-assorbenza tas-solvent fl-isfond).

1.4.2.2.4 Il-kontroll pożittiv:

Kimika fototossika magħrufa għandha tiġi ttestjata fl-istess ħin ma' kull test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU. Huwa rakkomandat il-chlorpromazine (CPZ). Għal CPZ ittestjat bil-protokoll standard fit-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU, ġew definiti dawn il-kriterji li ġejjin ta' l-aċċettazzjoni tat-test: CPZ irradjat (+Irr): IC_{50} = 0,1 sa 2,0 µg/ml, CPZ mhux irradjat (-Irr): IC_{50} = 7,0 sa 90,0 µg/mL. l-Fattur tal-Foto Irritazzjoni (PIF), għandu jkun > 6. Il-ħidma storika tal-kontroll pożittiv għandha tiġi mmonitorjata.

Kimiċi oħrajn fototossiċi, xierqa għall-klassi tal-kimika jew il-karatteristiċi tas-solubbiltà tal-kimika li qed tiġi evalwata, jistgħu jintużaw bħala l-kontrolli pożittivi konkurrenti minflok chlorpromazine.

1.4.3 **Il-proċedura tat-test (6)(7)(8)(16)(17):**

1.4.3.1 *L-1 jum:*

Ferra' 100 µL materjal tal-kultura fil-kontenituri periferali fi plattina tal-mikrotitru tal-kultura tat-tessut b'96-well (= vojta). F'dawj li jifdal, ferra' 100 µL sospensjoni ta' ċelloli ta' 1×10^5 ċelloli/mL fil-mezz tal-kultura (= 1×10^4 ċelloli/well). Għandhom jiġu ppreparati żewġ plattini għal kull serje ta' konċentrazzjonijiet individwali tas-sustanza tat-test, u għall-kontrolli tas-solventi u dawk pożittivi.

Inkuba ċ-ċelloli għal 24 siegħa (ara t-taqsima 1.4.1.2) sakemm jiffurmaw nofs monosaff konfluwenti. Dan il-perjodu ta' inkubazzjoni jippermetti l-irkupru taċ-ċelloli, l-aderenza u t-tkabbir esponenzjali.

1.4.3.2 *It-2 jum:*

Wara l-inkubazzjoni, ferra' l-mezz tal-kultura miċ-ċelloli u aħsel bl-attenzjoni b'150 µL tat-taħlita *buffered* użata għall-inkubazzjoni. Żid 100 µL tal-*buffer* li jkun fih il-konċentrazzjoni xierqa tal-kimika jew tas-solvent tat-test (kontroll tas-solvent). Applika 8 konċentrazzjonijiet differenti tal-kimika tat-test. Inkuba ċ-ċelloli bis-sustanza tat-test fid-dlam għal 60 minuta (ara t-taqsima 1.4.1.2 u 1.4.1.4 tieni paragrafu).

Miż-żewġ plattini ppreparati għal kull serje ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u l-kontrolli, tingħażel waħda, ġeneralment bl-addoċċ, għad-determinazzjoni taċ-ċitotossiċità (-Irr) (jiġifieri l-plattina tal-kontroll), u waħda (il-plattina tat-trattament) għad-determinazzjoni tal-fototossiċità (+Irr).

▼B

Biex issir l-espożizzjoni +Irr, irradja ċ-ċelloli f'temperatura ambjentali għal 50 minuta mill-għatu tal-plattina 96-well bl-ogħla doża ta' radjazzjoni li mhijiex ċitotossika (ara wkoll l-Anness 2). Żomm il-plattini mhux irradjati (-Irr) f'temperatura tal-kamra f'kaxxa mudlama 50 min (= ħin ta' l-espożizzjoni għad-dawl).

Ferra' t-taħlita tat-test u aħsel bir-reqqa bl-attenzjoni b'150 µL tat-taħlita *buffered* użata għall-inkubazzjoni, iżda li ma fihiex il-materjal tat-test. Issostitwixxi l-*buffer* bil-mezz tal-kultura u inkuba (ara t-taqsima 1.4.1.2.) għal lejl sħiħ (18-22 h).

1.4.3.3 *It-3 jum:*

1.4.3.3.1 L-evalwazzjoni mikroskopika

Iċ-ċelloli għandhom jiġu eżaminati għat-tkabbir, għall-morfoloġija, u għall-integrità tal-monosaff bl-użu ta' mikroskopu b'faża tal-kuntrast. It-tibdil fil-morfoloġija taċ-ċelloli u l-effetti fuq it-tkabbir taċ-ċelloli għandu jiġi rrekordjat.

1.4.3.3.2 It-test ta' l-użu ta' l-Aħmar Newtrali

Aħsel iċ-ċelloli b'150 µL *buffer* imsaħħan minn qabel. Neħħi t-taħlita tal-ħasil billi ttektek bil-mod. Żid 100 µL ta' 50 µg/mL Aħmar Newtrali (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, numru EINECS 209-035-8; numru CAS 553-24-2; C.I. 50040) f'mezz mingħajr serum (16) u inkuba kif deskritt fil-paragrafu 1.4.1.2., għal 3 h.

Wara l-inkubazzjoni neħħi l-mezz ta' NR, u aħsel iċ-ċelloli b'150 µL mill-*buffer*. Ferra' u neħħi l-żejjed bl-ixxugar jew biċ-ċentrifugazzjoni.

Żid preċiżament 150 µL taħlita NR desorb (ippreparata friska 49 partijiet ilma + 50 partijiet etanol + 1 parti aċidu aċetiku).

Ħawwad il-plattina tal-mikrotitru bil-mnod fuq oġġett li jħawwad il-plattina tal-mikrotitru għal 10 minuti sakemm l-NR ikun ġie estratt miċ-ċelloli u jkun iffurma taħlita omoġena. Kejjel id-densità ottika ta' l-estratt ta' l-NR f'540 nm fi spettrofotometru, bl-użu tal-vojt bħala referenza. Issejvja d-data f'format xieraq ta' fajl elettroniku għall-analiżi wara.

2. **ID-DATA**

IL-KWALITÀ U L-KWANTITÀ TAD-DATA

Id-data tat-test tippermetti analiżi sinjifikanti tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni, u jekk possibbli l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test li biha l-vijabilità hija mnaqqsa għal 50 % (IC_{50}). Jekk tinsab iċ-ċitotossiċità, kemm il-firxa tal-konċentrazzjoni kif ukoll l-interċett tal-konċentrazzjonijiet individwali għandhom jiġu stabbiliti b'tali mod li tkun possibbli li toqgħod kurva għad-data esperimentali.

Għar-riżultati kemm ċarament pożittivi kif ukoll dawk ċarament negattivi (ara t-taqsima 2.3, l-ewwel paragrafu), l-esperiment primarju, sostnut minn esperiment(i) wieħed jew aktar preliminary tas-sejba tad-doża, jista' jkun biżżejjed.

▼B

Ir-riżultati ekwivoċi, li huma fil-limitu, jew mhux ċari għandhom jiġu ċċarati bl-użu ta' aktar ittestjar (ara wkoll it-taqsima 2.4, tieni paragrafu). F'dawn il-każijiet, il-modifika tal-kundizzjonijiet esperimentali għandha tiġi kkunsidrata. Il-kundizzjonijiet esperimentali li jistgħu jiġu mmodifikati jinkludu l-firxa jew l-ispazjar tal-konċentrazzjoni, il-ħin ta' qabel l-inkubazzjoni, u l-ħin ta' l-espożizzjoni għall-irradjazzjoni. Ħin iqsar ta' espożizzjoni jista' jkun xieraq għall-kimiċi li mhumiex stabbli fl-ilma.

L-EVALWAZZJONI TAR-RIZULTATI

Biex tkun possibbli l-evalwazzjoni tad-data, jista' jiġi kkalkolat Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF) jew Foto Effett Medju (MPE – *mean photo effect*).

Għall-kalkolu tal-miżuri tal-fotoċitossiċità (ara taħt), is-sett ta' valuri diskreti tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni għandu jiġi approssimat b'kurva xierqa kontinwa tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni (mudell). It-tqegħid tal-kurva għad-data spiss isir b'metodu ta' regressjoni mhux lineari (18). Biex tiġi stmata l-influwenza tal-varjabbiltà tad-data fuq il-kurva mqiegħda hija rrakkomandata proċedura *bootstrap*.

Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF) jiġi kkalkolat bl-użu ta' din il-formula:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Jekk ma jistax jiġi kkalkolat l-IC_{50} fil-preżenza jew fin-nuqqas tad-dawl, PIF ma jistax jiġi ddeterminat għall-materjal tat-test. Il-foto effett medju (MPE) huwa bbażat fuq it-tqabbil tal-kurvi sħaħ tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni (19). Huwa ddefinit bħala l-medju bil-piż tul sett rappreżentattiv ta' valuri tal-foto effett

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Il-foto-effett PE_c fi kwalunkwe konċentrazzjoni C huwa definit bħala l-prodott ta' l-effett tar-reazzjoni RE_c u l-effett tad-doża DE_c i.e. $PE_c = RE_c \times DE_c$. L-effett tar-reazzjoni RE_c huwa d-differenza bejn ir-reazzjonijiet osservati fin-nuqqas u fil-preżenza tad-dawl, jiġifieri. $RE_c = R_c (-Irr) - R_c (+Irr)$. L-effett tad-doża jingħata b':

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

fejn C* tirrappreżenta l-konċentrazzjoni ta' l-ekwivalenza, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha r-reazzjoni ta' +Irr hija daqs ir-reazzjoni ta' –Irr fil-konċentrazzjoni C. Jekk C* ma tista'x tiġi determinata minħabba li l-valuri tar-reazzjoni tal-kurva +Irr huma sistematikament ogħla jew aktar baxxi minn $R_C(-Irr)$ l-effett tad-doża huwa stabbilit bħala 1. Il-fatturi tal-piżijiet w_i jingħataw bl-ogħla valur ta' reazzjoni, jiġifieri w_i = MAX {R_i (+Irr), R_i (-Irr) }. Ix-xibka tal-kaxxi tal-konċentrazzjoni C_i tingħażel b'tali mod li l-istess għadd ta' punti jaqa' taħt kull wieħed mill-intervalli tal-konċentrazzjoni definiti mill-valuri tal-konċentrazzjoni użati fl-esperiment. Il-kalkolu ta' l-MPE huwa ristrett għall-valur massimu ta' konċentrazzjoni li fiha għall-inqas waħda miż-żewġ kurvi għadha turi valur ta' reazzjoni ta' mhux inqas minn 10 %. Jekk din il-konċentrazzjoni massima hija ogħla mill-ogħla konċentrazzjoni użata fl-esperiment +Irr il-parti residwali tal-kurva +Irr hija stabbilita bħala l-valur ta' reazzjoni "0". Skond jekk il-valur ta' l-MPE huwiex akbar minn valur ta' limitu magħżul tajjeb (MPE_c = 0,15), il-kimika hija kklassifikata bħala fototossika.

▼B

Pakkett ta’ softwer għall-kalkolu tal-PIF u tal-MPE huwa disponibbli minn (20).

L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Fuq bażi ta’ l-istudju tal-validazzjoni (8), sustanza tat-test b’PIF < 2 jew MPE < 0,1 tbassar: “ebda fototossiċità”. PIF > 2 u < 5 jew MPE > 0,1 u < 0,15 tbassar: “fototossiċità probabbli”; u PIF > 5 jew MPE > 0,15 tbassar: “fototossiċità”.

Għal kwalunkwe laboratorju li jista’bbilixxi din l-analiżi għall-ewwel darba, il-materjali ta’ riferenza elenkati fit-Tabella 1 għandhom jiġu ttestjati qabel ma jiġu ttestjati s-sustanzi tat-test għall-istima fototossika. Il-valuri tal-PIF jew ta’ l-MPE għandhom ikunu qrib il-valuri msemmija fit-Tabella 1.

Tabella 1

Isem il-kimika	Nru EINECS	Nru CAS	PIF	MPE	L-ogħla punt ta’ l-assorbiment	Solvent (1)
Amiodarone HCL	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (fl-ispalla)	ehanol
Choloropromazine HCL	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitrile
Anthracene	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-Histidine		[7006-35-1]	no PIF	0,05-0,10	211 nm	Ilma
Hexacholorophene	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (fl-ispalla)	etanol
Sodium lauryl sulphate	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	l-ebda assorbiment	Ilma

(1) Solvent użat biex jitkejjel l-assorbiment.

L-INTERPRETAZZJONI TAD-DATA

Jekk l-effetti fototossiċi huma osservati biss fl-ogħla test tal-konċentrazzjoni (speċjalment għall-kimiċi tat-test li jinħallu fl-ilma) jistgħu jkunu meħtieġa kunsiderazzjonijiet addizzjonali għall-istima ta’ l-azzard. Dawn jistgħu jinkludu d-data dwar l-assorbiment mill-ġilda, u l-akkumulazzjoni tal-kimika fil-ġilda u/jew data minn testijiet oħrajn, eż. l-ittestjar tal-kimika fil-ġilda ta’ l-annimali jew umana *in vitro*, jew mudelli tal-ġilda.

▼B

Jekk ma tintwera ebda tossiċità (+Irr u -Irr), u jekk is-solubilità llimitat il-konċentrazzjonijiet li setgħu jiġu ttestjati, il-kompatibilità tas-sustanza tat-test ma' l-analiżi tista' tiġi fid-dubju u t-testjar konfermatorju għandu jiġi kkonsidrat bl-użu, eż. ta' mudell ieħor.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi għall-inqas din l-informazzjoni li ġejja:

Is-Sustanza tat-Test:

— id-data ta' l-identifikazzjoni, ismijiet ġeneriċi komuni u n-numri IUPAC u CAS, jekk magħrufin;

— in-natura fiżika u safa;

— il-karatteristiċi fiżikokimiċi jekk inhuma rilevanti għat-twettiq ta' l-istudju;

— l-ispettru ta' l-assorbiment UV/vis;

— l-istabilità, u l-fotostabilità jekk magħrufin.

Solvent:

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;

— solubilita tal-kimika tat-test fis-solvent;

— persentaġġ tas-solvent preżenti fil-mezz tat-trattament.

Iċ-ċelloli

— tip u għajn taċ-ċelloli;

— nuqqas ta' mycoplasma;

— l-għadd tal-mogħdija taċ-ċelloli, jekk magħruf;

— Is-sensittività taċ-ċelloli għar-radjazzjoni, ddeterminata bit-tagħmir ta' l-irradjazzjoni użat fit-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU;

Il-kundizzjonijiet tat-test (1); *inkubazzjoni qabel u wara t-trattament:*

— tip u kompożizzjoni tal-mezz tal-kultura;

— kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni (konċentrazzjoni ta' CO_2; temperatura; umdità);

— kemm iddum l-inkubazzjoni (qabel it-trattament; wara t-trattament).

Il-kundizzjonijiet tat-test (2); *trattament bil-kimika:*

— ir-raġuni għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test użati fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni;

— fil-każ ta' solubilità limitata tal-kimika tat-test u ta' nuqqas ta' ċitotossiċità: ir-raġuni għall-ogħla konċentrazzjoni ttestjata;

— tip u kompożizzjoni tal-mezz tat-trattament (taħlita ta' melħ buffered);

— kemm idum it-trattament kimiku.

Il-kundizzjonijiet tat-test (3); *l-irradjazzjoni:*

— ir-raġuni għall-għażla ta' l-għajn tad-dawl użat;

▼B

— manifattur u tip ta' għajn tad-dawl u radjometru;

— karatteristiċi ta' l-irradjanza spettrali ta' l-għajn tad-dawl;

— karatteristiċi ta' trażmissjoni u assorbiment tal-fitru/i użat(i);

— karatteristiċi tar-radjometru u d-dettalji dwar il-kalibrazzjoni tiegħu;

— distanza ta' l-għajn tad-dawl mis-sistema tat-test;

— l-irradjanza tal-UVA f'din id-distanza, espresso f'mW/cm^2;

— kemm iddum l-espożizzjoni tad-dawl UV/vis;

— doża ta' l-UVA (irradjanza x ħin), espressa f'J/cm^2;

— temperatura tal-kulturi taċ-ċelloli matul l-irradjazzjoni u l-kulturi taċ-ċelloli li jinżammu fid-dlam konkorrentement.

Il-kundizzjonijiet tat-test (4); *test tal-vijabilità ta' l-Aħmar Newtrali:*

— kompożizzjoni tal-mezz tat-trattament ta' l-Aħmar Newtrali;

— kemm iddum l-inkubazzjoni ta' l-Aħmar Newtrali;

— kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni (konċentrazzjoni ta' CO_2; temperatura; umdità);

— kundizzjonijiet ta' l-estrazzjoni ta' l-Aħmar Newtrali (estrattant; kemm idum);

— *wavelength* użata għall-qari spettrofotometriku tad-densità ottika ta' l-Aħmar Newtrali;

— tieni *wavelength* (referenza), jekk tintuża;

— kontenut ta' vojt ta' l-ispettrofotometru, jekk użat.

Riżultati:

— il-vijabilità taċ-ċelloli miksuba f'kull konċentrazzjoni tal-kimika tat-test, espressa f'persentaġġ ta' vijabilità ta' kontrolli solventi medji u konkorrenti;

— kurvi tar-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni (konċentrazzjoni tal-kimika tat-test vs. vijabilità relattiva taċ-ċelloli) miksuba f'esperimenti konkorrenti +Irr u -Irr;

— analiżi tal-kurvi tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni: jekk possibbli, il-komputazzjoni/kalkolu ta' l-IC_{50} (+Irr) u IC_{50} (-Irr);

— tqabbil ta' żewġ kurvi tar-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni, bil-kalkolu tal-Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF), jew bil-kalkolu tal-Foto Effett Medju (MPE);

— il-kriterji ta' l-aċċettazzjoni tat-test; il-kontroll konkurrenti tas-solvent:

— il-vijabilità assoluta (densità ottika ta' l-estratt ta' l-Aħmar Newtrali) ta' ċelloli irradjati u mhux irradjati;

— id-data storika tal-kontrolli negattivi u dawk solventi; devjazzjonijiet medji u dawk standard;

— kriterji ta' l-aċċettazzjoni tat-test; kontroll pożittiv konkurrenti;

▼B

— IC_{50}(+Irr) u IC_{50}(-Irr) u PIF/MPE tal-kimika tal-kontroll pożittiv;

— id-data storika tal-kontrolli pożittivi kimiċi: IC_{50}(+Irr) u IC_{50}(-Irr) u PIF/MPE; devjazzjonijiet medji u dawk standard.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. *In vitro* 7: 95-102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-V.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. Tieni edizzjoni, p 79-110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Pariġi.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. *In vitro* 8, 793-796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 ta' Novembru 1997, ATLA, 26, 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. *In vitro* 12, 305-327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15 ta' Marzu 2002, OECD ENV/EHS, disponibbli fuq talba mis-Segretarjat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119-124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. Ħames edizzjoni, p 515-530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 ta' Settembru, 1998. 18 paġni.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

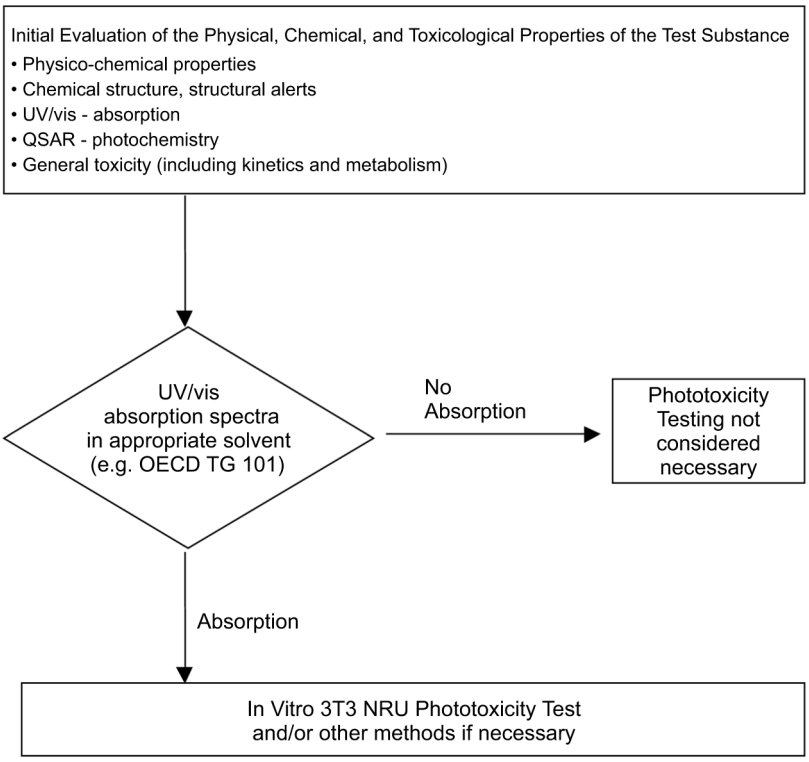
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_234-9687_1_1_1_1,00.html

▼B

L-ANNESS 1

Ir-rwol tat-3T3 NRU PT fi strateġija sekwenzjali għall-ittestjar tal-fototossiċità tal-kimiċi

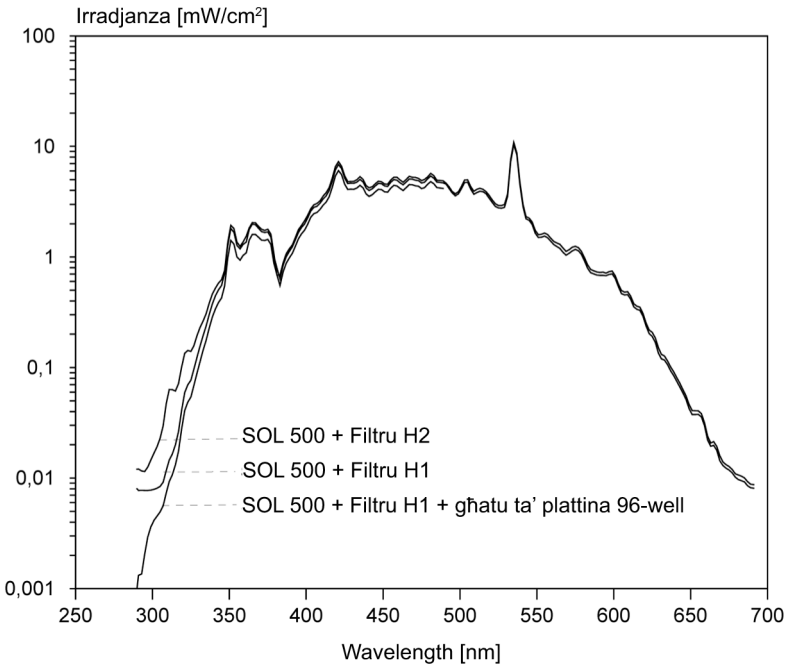


▼B

L-ANNESS 2

Figura 1

Distribuzzjoni ta' poter spettrali tas-simulatur tax-xemx iffiltrat



(ara t-taqsima 1.4.1.5, tieni paragrafu)

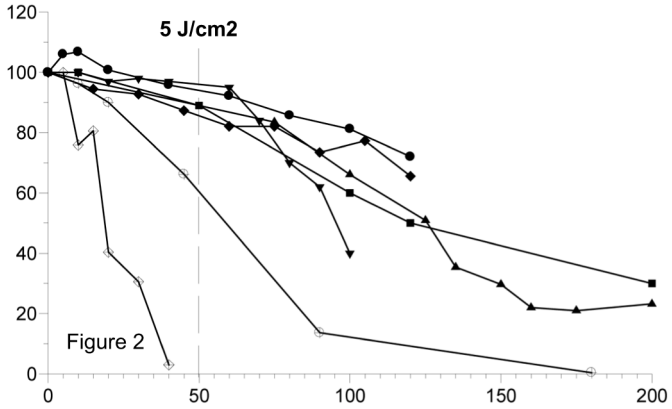
Il-Figura 1 tagħti eżempju ta' distribuzzjoni ta' irradjanza spettrali aċċettabbli ta' simulatur tax-xemx iffiltrat. Huwa mill-għajn ta' alid tal-metall *doped* fil-prova tal-validazzjoni tat-3T3 NRU PT (6)-(8)(17). L-effett ta' żewġ filtri differenti użati u l-effett addizzjoni ta' filtri ta' l-għatu ta' plattina 96-well tal-kultura huma murija. Il-filtru H2 intuża biss ma' sistemi tat-test li jistgħu jittolleraw ammont ogħla ta' UVB (test tal-mudell tal-ġilda u ttest tal-fotoħemoliżi taċ-ċelloli ħomor tad-demm). Fit-3T3 NRU-PT intuża l-filtru H1. Il-figura turi li l-effett addizzjonali ta' filtru ta' l-għatu tal-plattina huwa l-aktar osservat fil-firxa ta' l-UVB, u xorta jħallu biżżejjed UVB fl-ispettru ta' l-irradjazzjoni biex jiġu eċċitati l-kimiċi li tipikament jassorbu l-firxa ta' l-UVB, bħall-Amiodarone (ara t-Tabella 1).

▼B

Figura 2

Is-sensittività ta' l-irradjazzjoni taċ-ċelloli Balb/c 3T3 (kif imkejla fil-firxa UVA)

Il-vijabilità taċ-ċelloli (% użu ta' l-Aħmar Newtrali tal-kontrolli skuri)



(ara t-taqsimiet 1.4.1.5.2 tieni paragrafu; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Is-sensittività taċ-ċelloli Balb/c 3T3 għall-irradjazzjoni mas-simulatur tax-xemx użat fil-prova tal-validazzjoni tat-Test tal-Fototossiċità 3T3NRU, kif imkejla fil-firxa ta' l-UVA. Il-figura turi r-riżultati miksuba f'7 laboratorji differenti fl-istudju tal-pre-validazzjoni (1). Filwaqt li ż-żewġ kurvi b'simboli miftuħa nkisbu b'ċelloli li saru anzjani (numru għoli ta' passaġġi), li kellhom jiġu sostitwiti b'ħażniet ta' ċelloli ġodda il-kurvi bis-simboli li jispikkaw juru ċ-ċelloli b'tolleranza ta' irradjazzjoni aċċettabbli.

Minn din id-data ġiet derivata l-ogħla irradjazzjoni mhux ċitotossika ta' 5 J/cm^2 (linja ttikkjata vertikali). Il-linja ttikkjata orizzontali turi barra minn dan l-effett massimu aċċettabli ta' l-irradjazzjoni mogħti fil-paragrafu 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULA TAL-LIMFA LOKALI**

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. Il-Metodu ta' Ttestjar oriġinali (TM) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali (LLNA; Linja Gwida ta' Ttestjar 429 tal-OECD; il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness) ġie adottat qabel (1) Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u analiżi tax-xogħol assoċjat ġew ippubblikati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). L-LLNA aġġornata hija bbażata fuq l-evalwazzjoni tal-esperjenza u tad-dejta xjentifika (12). Dan huwa t-tieni TM imfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. It-TM l-ieħor (jiġifieri l-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar; il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness) juża testijiet fuq il-fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni fuq il-fenek tal-Indi u t-test Buehler (13). L-LLNA tipprovdi vantaġġi fuq il-B.6 u fuq il-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13) fir-rigward tal-benessri tal-annimali. Dan it-TM aġġornat tal-LLNA jinkludi sett ta' Standards ta' Prestazzjoni (PS) (Appendiċi 1) li jistgħu jintużaw fl-evalwazzjoni tal-istatus ta' validazzjoni ta' metodi ġodda u/jew mibdula ta' ttestjar li huma mekkanikament u funzjonalment simili għal-LLNA, f'konformità mal-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida Nru 34 tal-OECD (14).

2. L-LLNA tistudja l-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva adattata għall-valutazzjoni tad-doża u r-reazzjoni. Għandu jiġi nnotat li s-sensitizzaturi ħfief/moderati li huma rrakkomandati bħala sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv adattati (PC) għall-metodi ta' ttestjar fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B. 6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13) huma adattati wkoll għall-użu mal-LLNA (6) (8) (15). L-approċċ ta' LLNA mnaqqsa (rLLNA), li tista' tuża sa 40 % inqas annimali huwa deskritt ukoll bħala għażla f'dan it-TM (16) (17) (18). L-rLLNA tista' tintuża meta jkun hemm ħtieġa regolatorja li tiġi kkonfermata previżjoni negattiva tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, sakemm ikun hemm konformità mal-ispeċifikazzjonijiet l-oħrajn kollha ta' protokoll tal-LLNA, kif deskritt f'dan it-TM. Il-previżjoni ta' eżitu negattiv għandha ssir fuq il-bażi tal-informazzjoni kollha disponibbli kif deskritt fil-paragrafu 4. Qabel ma jiġi applikat l-approċċ rLLNA, għandhom jiġu pprovduti ġustifikazzjonijiet ċari u loġika xjentifika għall-użu tiegħu. Jekk, kontra dak mistenni, jinkiseb riżultat pożittiv jew ekwivoku fl-rLLNA, jista' jkun meħtieġ aktar ittestjar sabiex tiġi interpretata jew iċċarata s-sejba. L-rLLNA ma għandhiex tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi ta' testijiet li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni bħas-subkategorizzazzjoni għar-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet u s-Sistema Globalment Armonizzata tan-NU tal-Klassifikazzjoni u t-Tikkettar tas-Sustanżi Kimiċi.

DEFINIZZJONIJIET

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA tipprovdi metodu alternattiv għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda. Dan mhux neċessarjament jimplika li l-LLNA għandha tintuża minflok it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi fil-każijiet kollha (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma. Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq

▼M3

is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA hijiex adattata għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA-ara l-paragrafu 5) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Għandu, madankollu, il-potenzjal li jnaqqas l-għadd ta' annimali meħtieġa għal dan il-għan. Barra minn hekk, l-LLNA toffri rfinar sostanzjali (inqas uġigħ u tbatija) fil-mod kif jintużaw l-annimali għall-ittestjar tas-sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. L-LLNA hija bbażata fuq il-konsiderazzjoni ta' avvenimenti immunoloġiċi stimulati b'sustanzi kimiċi matul il-fażi induttiva tas-sensitizzazzjoni. Għall-kuntrarju tat-testijiet fuq il-fenek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13) l-LLNA ma teħtieġx li r-reazzjonijiet tal-ipersensittività tal-ġilda indotti bi sfida jkunu eluċidati. Barra minn hekk, l-LLNA ma teħtieġx l-użu ta' aġġuvant, bħal fil-każ tat-test tal-massimizzazzjoni fuq il-fenek tal-Indi (13). Għalhekk, l-LLNA tnaqqas l-uġigħ u t-tbatija tal-annimali. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar, għandu jkun rikonoxxut li hemm ċerti limitazzjonijiet li jistgħu jkunu jeħtieġu l-użu ta' B.6 jew tal-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13) (eż. sejbiet negattivi foloz fl-LLNA b'ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal ċerti sustanzi kimiċi tat-tip tensjoattivi] (19) (20), jew solubbiltà tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (21) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13). Barra minn hekk, skont il-bażi tad-dejta ta' validazzjoni limitata, li kienet tikkonsisti prinċipalment minn formulazzjonijiet ta' pestiċidi, l-LLNA aktarx li tagħti aktar riżultat pożittiv mit-test fuq il-fniek tal-Indi għal dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test (22). Madankollu, meta wieħed jeżamina l-formulazzjonijiet, jista' jikkunsidra li jinkludi sustanzi simili b'riżultati magħrufa bħala sustanzi ta' referenza sabiex juri li l-LLNA qiegħda taħdem kif suppost (ara l-paragrafu 16). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA għandha tkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi li jistgħu jinterferixxu mal-eżattezza tal-LLNA.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (vehicle treated control, VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjaħ l-Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI), jiġi stabbilit, u għandu jkun $\geq$ 3 qabel ma tkun meħtieġa l-klassifikazzjoni tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu ta' tikkettar radjoattiv *in vivo* għall-kejl ta' żieda fl-għadd ta' ċelloli proliferanti fin-noduli tal-limfa awrikolari li jsaffu. Madankollu, jistgħu jintużaw għanijiet finali oħrajn għall-valutazzjoni tal-għadd ta' ċelloli proliferanti sakemm ir-rekwiżiti tal-PS ikunu għalkollox issodisfati (Appendiċi 1).

▼M3

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

L-għażla tal-ispeċijiet tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi magħżula għal dan it-test. Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħażagħ tar-razza CBA/Ca jew CBA/J, li jkunu għadhom mhux mgħammra u mhux tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA.

Il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ u l-għalf

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (23), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umditá relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 % ħlief waqt it-tindif tal-kamra, l-għan għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, u 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel ma jibda t-trattament, l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati sabiex jiġi żgurat li ma jkollhom l-ebda ferita osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Is-sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli bħala sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex din turi l-kompetenza tal-laboratorju li jwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Huwa meħtieġ ukoll PC għal kull studju wkoll minn ċerti awtoritajiet regolatorji u għaldaqstant l-utenti huma mħeġġa sabiex jikkonsultaw lill-awtoritajiet rilevanti qabel ma jwettqu l-LLNA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu r-rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandu jipproduċi reazzjoni tal-LLNA pożittiva f'livell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 3 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma

▼M3

tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni tkun riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 20 ikun eċċessiv). Il-PC preferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Chemical Abstracts Service [CAS] Nru tal-CAS 101-86-0) fl-aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v) u 5 % merkaptobenżotijażol (Nru tal-CAS 149-30-4) f'*N,N*-dimetil-formammid (ara l-Appendiċi 1, it-Tabella 1). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Għalkemm l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storiku stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC f'mill-inqas 10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom ikunu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati ta' studju negattivi ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodiku aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodiku mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubjuż. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom jiġu kkunsidrati b'attenzjoni meta jiġi deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (12).

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat fil-mezz li huwa magħruf li jqanqal reazzjoni konsistenti (eż. aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom l-ittestjar f'mezz mhux standard (formulazzjoni rilevanti klinikament/kimikament) ikun meħtieġ ukoll (24). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanju.

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex isib il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

— xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,

— karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,

— dejta ta' appoġġ mil-LLNA,

— dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

▼M3

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli ta' doża

17. Minimu ta' erba' annimali għandhom jintużaw għal kull grupp ta' doża, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u PC (simultanju jew reċenti, ibbażat fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dożi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Ħlief għan-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom ikunu mmaniġġjati u ttrattati bl-istess mod bħall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi (3) u (5). Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (3) (25). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (19) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet jista' jkun meħtieġ li jintuża solvent klinikament rilevanti jew il-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test tkun ikkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi tat-test idrofiliċi jkunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi għalkollox likwidi għandhom jiġu evitati.

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara l-paragrafu 35). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tinġabar dejta dwar annimali individwali (12). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Madankollu, id-dejta dwar gruppi ta' annimali tista' titqies aċċettabbli minn ċerti awtoritajiet regolatorji u f'dawn is-sitwazzjonijiet, l-utenti jista' jkollhom l-għażla li jiġbru kemm dejta dwar annimali individwali kif ukoll dejta dwar gruppi ta' annimali.

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun iddeterminata l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara l-paragrafu (18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi ddefinit il-livell ta' doża xierqa li għandha tkun ittestjata fl-LLNA. L-iskop tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell massimu ta' doża li għandu jintuża fl-istudju ewlieni tal-LLNA, meta l-informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li tikkawża tossiċità sistemika (ara l-paragrafu 24) u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda (ara l-paragrafu 23) ma tkunx disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

▼M3

22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir skont l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA, ħlief għall-fatt li ma jkunx hemm valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 6). Il-widnejn ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema (ħmura) u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (25). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta' gejġ ta' ħxuna (*eż.* mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) f'Jum 1 (qabel id-doża), f'Jum 3 (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), u f'Jum 6. Barra minn hekk, fis-sitt Jum, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥ 3 u/jew żieda fil-ħxuna tal-widna ta' ≥ 25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (26) (27). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta' 25 % fil-ħxuna tal-widna (26) (27), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (35) (36) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (*eż.* pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispnea, nifs maqtugħ, u ħsejjes fil-pulmun (rales)), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' > 5 % fil-piż tal-ġisem mill-ewwel Jum sas-sitt Jum, u l-imwiet għandhom jiġu kkunsidrati fil-valutazzjoni. Annimali li waslu biex imutu jew annimali li jkunu viżibilment muġugħa jew li juru sinjali ta' tbatija kbira u persistenti għandhom jinqatlu b'mod uman (37).

▼M3

Skeda ta' sperimentazzjoni tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda ta' sperimentazzjoni tal-analiżi hija kif ġej:

— *L-ewwel Jum:* Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15), fuq il-wara ta' kull widna.

— *It-tieni u t-tielet Jum:* Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni li għamilt fl-ewwel Jum.

— *Ir-raba' u l-ħames Jum:* L-ebda trattament.

— *Is-sitt jum:* Ħu nota tal-piż ta' kull annimal. Injetta 250 µL ta' soluzzjoni ta' ilma bil-melħ ibbaferjata bil-fosfat (phosphate-buffered saline, PBS) sterili li fih 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) ta' (^{3}H)-metiltimidin ittritjat fil-ġrieden kollha tat-test u tal-kontroll permezz tal-vina fid-denb. Inkella, injetta 250 µL PBS sterili li fih 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ta' ^{125}I-jododeossiuridin u 10^{-5}M fluworodeossiuridin fil-ġrieden kollha permezz tal-vina fid-denb. Ħames (5) sigħat wara, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' n-noduli limfatiċi awrikolari li jnixxu minn kull widna tal-ġrieden u pproċessa flimkien f'PBS għal kull annimal (metodu b'annimali individwali); inkella aqta' u iġbor in-noduli limfatiċi minn kull widna f'PBS għal kull grupp ta' trattament (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura). Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (12). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta' gejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Sospensjoni ta' ċellola waħda ta' ċelloli tan-noduli limfatiċi (LNC) maqtugħa minn żewġ naħat permezz tal-metodu b'annimali individwali jew inkella, il-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura titħejja permezz ta' diżaggregazzjoni mekkanika ħafifa minn ġo garża ta' 200 micron-tal-azzar inossidabbli jew teknika aċċettabbli oħra għall-ġenerazzjoni ta' sospensjoni ta' ċellola waħda. L-LNC jinħaslu darbtejn b'eċċess ta' PBS u d-DNA jiġi sseparat b'5 % aċidu trikloroaċetiku (TCA) f'4 °C għal 18-il siegħa (3). Il-pelits jew jiġu sospiżi mill-ġdid f'1mL TCA u trasferiti f'kunjetti ta' xintillazzjoni li jkun fihom 10mL ta' likwidu ta' xintillazzjoni għall-għadd ta' ^{3}H, jew trasferiti direttament f'tubi għall-għadd tal-gamma għall-għadd ta' ^{125}I.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli (radjuattività inkorporata)

27. L-inkorporazzjoni ta' ^{3}H-metiltimidin titkejjel bl-għadd ta' xintillazzjoni β bħala diżintegrazzjonijiet kull minuta (DPM). L-inkorporazzjoni ta' ^{125}I-jododeossiuridin titkejjel bl-għadd ta' ^{125}I u hija espressa wkoll bħala DPM. Skont il-metodu użat, l-inkorporazzjoni hija espressa bħala DPM/ġurdien (metodu b'annimali individwali) jew DPM/grupp ta' trattament (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura).

LLNA mnaqqas

28. F'ċerti sitwazzjonijiet, meta jkun hemm ħtieġa regolatorja li tkun ikkonfermata l-previżjoni negattiva tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, jista' jintuża protokoll fakultattiv ta' rLLNA (16) (17) (18) b'inqas annimali, sakemm ikun hemm konformità mal-ispeċifikazzjonijiet l-oħrajn kollha tal-protokoll tal-LLNA f'dan it-TM. Qabel ma jiġi applikat l-approċċ ta' rLLNA, għandhom jiġu pprovduti ġustifikazzjonijiet ċari u loġika xjentifika għall-użu tiegħu. Jekk jinkiseb riżultat pożittiv jew ekwivoku, jista' jkun meħtieġ aktar ittestjar sabiex is-sejba tiġi interpretata jew iċċarata.

▼M3

29. It-tnaqqis fl-għadd ta' gruppi ta' doża huwa l-unika differenza bejn il-protokolli tal-metodi tat-testijiet LLNA u rLLNA u għal din ir-raġuni l-rLLNA ma tipprovdix informazzjoni dwar id-doża u r-reazzjoni. Għalhekk, l-rLLNA ma għandhiex tintuża meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar id-doża u r-reazzjoni. Bħal-LLNA b'diversi dożi, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ivvalutata fl-rLLNA għandha tkun il-konċentrazzjoni massima li ma tikkawżax tossiċità sistemika evidenti u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda fil-ġurdien (ara l-paragrafu 18).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

30. Kull ġurdien għandu jkun osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjanijiet ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (37).

Piżijiet tal-ġisem

31. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman li tkun skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

32. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI. Meta jintuża l-metodu b'annimali individwali, l-SI jinstab billi wieħed jiddividi d-DPM/ġurdien medju f'kull grupp tas-sustanza tat-test, u l-grupp PC, bid-DPM/ġurdien medju għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed. Meta jintuża l-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura, l-SI jinstab billi wieħed jiddividi l-inkorporazzjoni radjuattiva miġbura għal kull grupp ta' trattament bl-inkorporazzjoni tal-grupp VC miġbur; dan jagħti SI medju.

33. Il-proċess ta' deċiżjoni jqis riżultat pożittiv meta l-SI ≥ 3. Madankollu, il-qawwa tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali jiġix iddikjarat pożittiv (4)(5)(6).

34. Jekk ikun jeħtieġ li jiġu ċċarati r-riżultati miksuba, għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensitizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall f'parti oħra (7).

35. Il-ġbir ta' dejta dwar ir-radjuattività fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull evalwazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari ma' tqabbil ta' VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-evalwazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi bi jew mingħajr ċerti punti ta' dejta (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

▼M3

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

36. Id-dejta għandha titqassar f'tabelli. Meta wieħed juża l-metodu b'annimali individwali, għandu juri l-valuri DPM tal-annimal individwali, il-medja DPM/annimal tal-grupp, it-terminu tal-iżball assoċjat tagħha (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mal-grupp VC simultanju. Meta jintuża l-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura, wieħed għandu juri l-medja tad-DPM u l-SI medju għal kull grupp ta' doża mqabbel mal-grupp VC simultanju.

Rapport tat-test

37. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi tat-test u ta' kontroll:

— dejta dwar l-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott),

— in-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi (eż. volatilità, stabbiltà, solubbiltà),

— f'każ ta' taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti.

Solvent/mezz:

— dejta dwar l-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat),

— raġuni għall-għażla tal-mezz.

Annimali tat-test:

— is-sors tal-ġrieden CBA,

— stat mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf,

— l-għadd u l-età tal-annimali,

— is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,

— raġuni għall-għażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),

— il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikata,

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),

— dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni,

— metodi ta' kejl tat-tossiċità,

— kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi,

— dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju.

Kontroll tal-affidabbiltà:

— sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użat,

— dejta dwar PC simultanju u/jew storiku u dwar NC simultanju għal-laboratorju li qed jagħmel it-test,

▼M3

— jekk ma kienx inkluż PC simultanju, id-dejta u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodiku reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta tal-PC storiku għal-laboratorju li jiġġustifika l-bażi għaliex ma sarx PC simultanju.

Riżultati:

— piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla skedata; kif ukoll il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,

— il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal,

— tabella tal-valuri DPM u tal-valuri SI għal kull ġurdien (metodu b'annimali individwali) jew medji (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura) għal kull grupp ta' trattament,

— il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għad-DPM/ġurdien għal kull grupp ta' trattament u r-riżultati tal-analiżi tal-anomaliji għal kull grupp ta' trattament meta jintuża l-metodu b'annimali individwali,

— l-SI kkalkulat u kejl xieraq ta' varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll meta jintuża l-metodu b'annimali individwali,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,

— analiżijiet statistiċi, fejn xieraq.

Diskussjoni tar-riżultati:

— kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13–31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999–1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985–997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327–33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49–59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258–273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274–286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249–257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71–89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Appendiċi 1

Standards tal-prestazzjoni għall-valutazzjoni ta' metodi ta' ttestjar LLNA (Local Lymph Node Assay) simili jew modifikati għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda

INTRODUZZJONI

1. L-għan tal-Istandards tal-Prestazzjoni (Performance Standards, PS) huwa li jikkomunikaw il-bażi li fuqha l-metodi ta' ttestjar, kemm ta' speċjalità (jiġifieri bid-dritt tal-awtur, bil-marka kummerċjali, irreġistrati) kif ukoll ġeneriċi jistgħu jiġu ddeterminati li għandhom biżżejjed preċiżjoni u affidabbiltà għal raġunijiet speċifiċi ta' ttestjar. Dawn il-PS, ibbażati fuq metodi ta' ttestjar validati u aċċettati, jistgħu jintużaw sabiex jevalwaw l-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodi simili oħra (li fil-lingwaġġ tat-taħdit komuni jissejħu testijiet "me-too") li huma bbażati fuq prinċipji xjentifiċi simili u sabiex ikejlu jew ibassru l-istess effett bijoloġiku jew tossiku (14).

2. Qabel l-adozzjoni tal-metodi modifikati (jiġifieri, titjib potenzjali propost għal metodu ta' ttestjar approvat), għandu jkun hemm evalwazzjoni sabiex jiġi ddeterminat l-effett tal-bidliet proposti fuq il-prestazzjoni tat-test u sa fejn dawn il-bidliet jaffettwaw l-informazzjoni disponibbli għall-komponenti l-oħra tal-proċess ta' validazzjoni. Skont l-għadd u t-tip ta' bidliet proposti, id-dejta u d-dokumentazzjoni ta' prova ġġenerati għal dawk il-bidliet, dawn għandhom ikunu jew soġġetti għall-istess proċess ta' validazzjoni kif spjegat għal test ġdid, jew, jekk dan ikun xieraq, għal valutazzjoni limitata ta' affidabbiltà u rilevanza billi jintużaw il-PS stabbiliti (14).

3. Metodi simili jew modifikati proposti għall-użu f'dan it-TM (Test Method) għandhom jiġu evalwati sabiex jiġu ddeterminati l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tagħhom billi jintużaw sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw il-firxa sħiħa tar-riżultati tal-LLNA. Sabiex jiġi evitat l-użu mhux neċessarju ta' annimali, huwa ferm rakkomandat li l-iżviluppaturi tal-mudell jikkonsultaw lill-awtoritajiet xierqa qabel ma jibdew l-istudji ta' validazzjoni, f'konformità mal-PS u l-gwida pprovduti f'dan it-TM.

4. Dawn il-PS huma bbażati fuq il-PS (12) armonizzati tal-US-ICCVAM, l-EC-ECVAM u l-JaCVAM-Ġappuniż, sabiex jiġu vvalidati verżjonijiet simili jew modifikati tal-LLNA. Il-PS jikkonsistu fil-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar, is-sustanzi ta' referenza rakkomandati u l-istandards għall-preċiżjoni u l-affidabbiltà li l-metodu propost għandu jilħaq jew jaqbeż.

I. **Komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar**

5. Sabiex jiġi żgurat li metodu tal-LLNA simili jew modifikat huwa analogu b'mod funzjonali u mekkanistiku għal-LLNA u jkejjel l-istess effett bijoloġiku, il-komponenti li ġejjin għandhom jiġu inklużi fil-protokoll tal-metodu ta' ttestjar:

— Is-sustanza tat-test għandha tiġi applikata b'mod topiku fuq iż-żewġ widnejn tal-ġurdien,

— Il-proliferazzjoni tal-limfoċiti għandha titkejjel fin-nodi limfatiċi li jkunu qed inixxu mill-post tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,

— Il-proliferazzjoni tal-limfoċiti għandha titkejjel waqt il-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda,

▼M3

— Għas-sustanzi tat-test, l-ogħla doża magħżula għandha tkun il-konċentrazzjoni massima li ma tipprovokax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni eċċessiva tal-ġilda lokali fil-ġurdien. Għal sustanzi kimiċi ta' referenza pożittivi, bħala minimu, l-ogħla doża għandha tkun għolja daqs il-valuri tal-EC3 (Konċentrazzjoni Stmata 3) tal-LLNA tas-sustanzi kimiċi ta' referenza korrispondenti (ara t-Tabella 1) mingħajr ma tiġi prodotta tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni eċċessiva tal-ġilda lokali tal-ġurdien,

— VC simultanju għandu jiġu inkluż f'kull studju u, fejn xieraq, għandu jintuża PC simultanju wkoll,

— Għandu jintuża minimu ta' erba' annimali għal kull grupp ta' dożi,

— Tista' tingħabar dejta individwali jew inkella fi grupp dwar l-annimali.

F'każ li ma jintlaħaqx xi wieħed minn dawn il-kriterji, dawn il-PS ma jistgħux jintużaw għall-validazzjoni ta' metodu simili jew modifikat.

II. **Lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' referenza**

6. Il-PS (12) armonizzati tal-US-ICCVAM, l-EC-ECVAM u l-JaCVAM-Ġappuniż identifikaw 18-il sustanza kimika ta' referenza minimi li għandhom jintużaw u erba' sustanzi kimiċi ta' referenza fakultattivi (jiġifieri sustanzi li jew ipproduċew riżultati pożittivi foloz jew inkella negattivi foloz fl-LLNA, meta mqabbla ma' riżultati fuq il-bnedim u fuq fniek tal-Indi (B.6, jew il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13), u għaldaqstant, jipprovdu l-opportunità li tintwera prestazzjoni tajba daqs l-LLNA jew aħjar) li huma inklużi fil-PS tal-LLNA. Il-kriterji tal-għażla għall-identifikazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienu:

— Il-lista ta' referenza tas-sustanzi kimiċi rrappreżentat it-tipi ta' sustanzi tipikament ittestjati għall-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u għall-firxa ta' reazzjonijiet li l-LLNA kapaċi jkejjel jew ibassar,

— Is-sustanzi kellhom strutturi kimiċi definiti sew,

— Id-dejta tal-LLNA minn testijiet fuq ħnieżer tal-Indi (jiġifieri B.6; il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13) u (fejn possibbli) id-dejta mill-bnedmin kienet disponibbli għal kull sustanza, u

— Is-sustanzi kienu disponibbli minn sors kummerċjali.

Is-sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati huma elenkati fit-Tabella 1. L-istudji li jużaw is-sustanzi kimiċi ta' referenza proposti għandhom jiġu evalwati fil-mezz li huma elenkati miegħu fit-Tabella 1. Fis-sitwazzjonijiet fejn sustanza elenkata ma tistax tkun disponibbli, jistgħu jintużaw sustanzi oħra li jissodisfaw il-kriterji tal-għażla msemmija, b'ġustifikazzjoni adegwata.

▼M3

Tabella 1

Sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati għall-ps tal-LLNA

Numru	Sustanzi kimiċi (1)	Nru tal-CAS	Forma	Mezz (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Firxa attwali tal-EC3	LLNA vs. Fenek tal-Indi	LLNA vs. Bniedem
1	5-Kloro-2-metil-4-isotijażolin-3-on (CMI)/2-metil-4-isotijażolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Lik	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilendiammina	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Klorur tal-kobalt	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoewġenol	97-54-1	Lik	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Merkaptobenżotijażol	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Ċitral	5392-40-5	Lik	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Lik	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Ewġenol	97-53-0	Lik	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenilbenżoat	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alkoħol ċinnamiku	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Urea tal-imidażolidinil	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metakrilat tal-metil	80-62-6	Lik	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Klorobenżen	108-90-7	Lik	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Lik	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Numru	Sustanzi kimiċi ([1])	Nru tal-CAS	Forma	Mezz ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Firxa attwali tal-EC3	LLNA vs. Fenek tal-Indi	LLNA vs. Bniedem
16	Aċidu lattiku	50-21-5	Lik	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Saliċilat tal-metil	119-36-8	Lik	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Aċidu saliċiliku	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Sustanzi fakultattivi sabiex Tintwera Prestazzjoni Mtejba Relatata mal-LLNA										
19	Sodju lauril sulfat	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Dimetakrilat tal-etilen glikol	97-90-5	Lik	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Ksilen	1330-20-7	Lik	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Klorur tan-nikil	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Taqsiriet: AOO = aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v); Nru tal-CAS = Numru tal-Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-dimetilformammid; DMSO = dimetil sulfossidu; DNCB = 2,4-dinitroklorobenżen; EC3 = stima ta' konċentrazzjoni meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' 3; GP = riżultat tat-test fuq il-fenek tal-Indi (jiġifieri B. 6 jew il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13); HCA = eżil ċinnamaldeid; Lik = likwida; LLNA = riżultat tal-Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali tal-ġrieden (jiġifieri B. 42 jew il-Linja Gwida 429 tat-Test tal-OECD) (1); MEK = metil etil keton; NA = mhux applikabbli peress li l-indiċi ta' stimulazzjoni huwa ta' < 3; NC = mhux ikkalkolata peress li d-dejta nkisbet minn studju wieħed; Sol = solida; Veh = mezz tat-test.

(*) Ġie supponut li s-sustanza mhijiex sensitizzatur fil-bnedmin minħabba l-fatt li ma nstabu l-ebda riżultati mit-test kliniku bl-impjastri (clinical patch test), mhijiex inkluża bħala allerġen fis-sett tat-test bl-impjastri, u ma nstabu l-ebda rapporti ta' każijiet ta' sensitizzazzjoni fil-bnedmin.

(**) Mhijiex disponibbli d-dejta mill-GP (fenek tal-Indi).

([1]) Is-sustanzi kimiċi għandhom jitħejjew ta' kuljum sakemm id-dejta ta' stabbiltà ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin.

([2]) Minħabba l-impatt potenzjali ta' mezzi differenti fuq il-prestazzjoni tal-LLNA, għandu jintuża l-mezz rakkomandat għal kull sustanza kimika ta' referenza (24) (32).

([3]) Il-valur medju fejn kien hemm disponibbli aktar minn valur wieħed tal-EC3. Għal sustanzi negattivi (jiġifieri bl-indiċi ta' stimolazzjoni < 3), hija pprovduta l-ogħla konċentrazzjoni ttestjata.

([4]) Għadd ta' studji tal-LLNA li minnhom inkisbet id-dejta.

([5]) Kummerċjalment disponibbli bħala Kathon CG (Nru tal-CAS 55965-84-9), li hija taħlita ta' 3:1 ta' CMI u MI. Il-konċentrazzjonijiet relattivi ta' kull firxa ta' komponenti minn 1,1 % sa 1,25 % (CMI) u 0,3 % sa 0,45 % (MI). Il-komponenti inattivi huma sustanzi tal-melħ tal-manjeżju (21,5 % sa 24 %) u nitrat tar-ram (0,15 % sa 0,17 %), bil-formulazzjoni li jifdal ta' 74 % sa 77 % ilma. Kathon CG hija disponibbli minnufih mingħand Sigma-Aldrich u Rohm and Haas (issa, Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Standards ta' affidabbiltà u preċiżjoni ddefiniti**

7. Il-preċiżjoni ta' metodu LLNA simili jew modifikat għandha tissodisfa jew taqbeż dik tal-PS tal-LLNA meta dan jiġi evalwat permezz tat-18-il sustanza kimika ta' referenza minimi li għandhom jintużaw. Il-metodu l-ġdid jew modifikat għandu jirriżulta fil-klassifikazzjoni korretta fuq il-bażi ta' deċiżjoni ta' "iva jew le". Madankollu, il-metodu l-ġdid jew modifikat jista' ma jikklassifikax b'mod korrett is-sustanzi kimiċi ta' referenza minimi kollha li għandhom jintużaw. Jekk, pereżempju, wieħed mis-sensitizzaturi dgħajfa jiġi kklassifikat ħażin, tista' titqies raġuni għall-klassifikazzjoni żbaljata u dejta addizzjonali adattata (pereżempju riżultati tat-test li jipprovdu klassifikazzjonijiet korretti għal sustanzi oħra b'karatteristiċi fiżiċi, kimiċi u sensitizzanti simili għal dawk tas-sustanza kimika ta' referenza klassifikata ħażin) sabiex tintwera prestazzjoni ekwivalenti. F'dawn iċ-ċirkostanzi, l-istatus ta' validazzjoni tal-metodu ta' ttestjar LLNA l-ġdid jew modifikat jiġi evalwat każ b'każ.

Riproduċibbiltà intralaboratorja

8. Sabiex tiġi stabbilita r-riproduċibbiltà intralaboratorja, metodu LLNA ġdid jew modifikat għandu jiġi eżaminat billi tintuża sustanza sensitizzanti li hija karatterizzata sew fl-LLNA. Għaldaqstant, il-PS tal-LLNA huma bbażati fuq il-varjabbiltà tar-riżultati minn testijiet ripetuti ta' eżil ċinnamaldeid (HCA). Sabiex tiġi eżaminata l-affidabbiltà intralaboratorja, il-limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt – treshold Estimated Concentration) għall-HCA għandhom jinġiebu minn erba' okkażjonijiet separati tal-inqas b'ġimgħa bejn it-testijiet. Riproduċibbiltà intralaboratorja aċċettabbli hija indikata mill-abbiltà tal-laboratorju li f'kull test tal-HCA jikseb il-valuri tal-ECt ta' bejn 5 % u 20 %, li jirrappreżentaw il-firxa ta' 0,5-2,0 darbiet l-EC3 medja speċifikata għall-HCA (10 %) fl-LLNA (ara t-Tabella 1).

Riproduċibbiltà interlaboratorja

9. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja ta' metodu LLNA ġdid jew modifikat għandha tiġi eżaminata billi jintużaw żewġ sustanzi sensitizzanti li huma karatterizzati sew fl-LLNA. Il-PS tal-LLNA huma bbażati fuq il-varjabbiltà tar-riżultati minn testijiet tal-HCA u 2,4-dinitroklorobenżen (DNCB) f'laboratorji differenti. Il-valuri tal-ECt għandhom jinġiebu b'mod indipendenti minn studju wieħed imwettaq tal-inqas fi tliet laboratorji separati. Sabiex tintwera r-riproduċibbiltà interlaboratorja aċċettabbli, kull laboratorju għandu jikseb il-valuri tal-ECt ta' 5 % sa 20 % għall-HCA u ta' 0,025 % sa 0,1 % għad-DNCB, li jirrappreżentaw il-medja ta' 0,5-2,0 darbiet il-konċentrazzjonijiet medji tal-EC3 speċifikati għall-HCA (10 %) u d-DNCB (0,05 %), rispettivament, fl-LLNA (ara t-Tabella 1).

▼M3

Appendiċi 2

Definizzjonijiet

Preċiżjoni: Il-viċinanza tal-qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija miżura ta' prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u aspett wieħed ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (14).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni li huwa indikattiv ta' rispons pożittiv.

Konċentrazzjoni stmata ta' tlieta (EC3): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' tlieta.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala negattiva jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl sa fejn il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hija ddeterminata matul il-proċessi ta' validazzjoni u ta' validazzjoni minn qabel, u tindika sa fejn test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (14).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (14).

Test "me-too": Espressjoni li tingħad fit-taħdit komuni għal metodu ta' ttestjar li huwa strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' referenza validat u aċċettat. Metodu ta' ttestjar bħal dan ikun kandidat għal validazzjoni rapida ("catch-up validation"). Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili (14).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħra f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Standards ta' Prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li huwa simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi: (i) komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati sabiex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' preċiżjoni u affidabbiltà, ibbażati fuq x'inkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta jiġi evalwat billi tintuża l-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (14).

Metodu ta' ttestjar ta' speċjalità: Metodu ta' ttestjar li l-manifattura u d-distribuzzjoni tiegħu huma ristretti minn privattivi, drittijiet tal-awtur, marki kummerċjali, eċċ.

▼**M3**

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li skontu jiġu vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Sustanzi kimiċi ta' referenza: Sustanzi kimiċi magħżula għall-użu fil-proċess ta' validazzjoni, li għalihom huma diġà magħrufa r-reazzjonijiet fis-sistema ta' ttestjar ta' referenza *in vitro* jew *in vivo* jew l-ispeċi ta' interess. Dawn is-sustanzi kimiċi għandhom ikunu rappreżentanti tal-klassijiet ta' sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni jintuża l-metodu ta' ttestjar, u dawn għandhom jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' reazzjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mis-sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni li jintuża dan il-metodu ta' ttestjar, minn qawwija, għal dgħajfa, sa negattivi. Settijiet differenti ta' sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa għall-istadji differenti tal-proċess ta' validazzjoni, u għal metodi ta' ttestjar u użi tat-testijiet differenti (14).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-konsiderazzjoni tal-preċiżjon (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (14).

Affidabbiltà: Kejl li jiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fi ħdan u bejn il-laboratorji maż-żmien, meta dan jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hija eżaminata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà intralaboratorja u dik interlaboratorja (14).

Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku induttur, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jeżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dik fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li hija msemmija wkoll sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih tlestew studji ta' validazzjoni sabiex jiġu ddeterminati r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabbiltà għal skop speċifiku. Huwa importanti li jiġi osservat li metodu ta' ttestjar validat jista' ma jkollux prestazzjoni suffiċjenti f'termini ta' preċiżjoni u affidabbiltà sabiex jitqies aċċettabbli għall-iskop propost (14).

▼B

B.43. **STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSIĊITÀ FL-ANNIMALI GERRIEMA**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għal OECD TG 424 (1997)

Dan il-Metodu tat-test kien ġie ddisinjat sabiex jakkwista l-informazzjoni meħtieġa ħalli jikkonferma jew aktar jikkaratterizza l-potenzal tan-newrotossiċità ta' kimika f'annimali adulti. Jista' jkun jew imwettaq flimkien mal-Metodi tat-Test eżistenti dwar l-istudji tat-tossiċità għal doża repetuta jew li jkun imwettaq bħala studju separat. Huwa rakkommandat li il-OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) jkun ikkonsultat sabiex jgħin fid-disinn ta' l-istudji bbażati fuq dan il-metodu ta' Test. Dan huwa partikolarment importanti meta modifiki ta' l-osservazzjonijiet u tal-proċeduri tat-test kif rakkommandat għall-użu b'rutina ta' dan il-metodu jkunu kkonsidrati. Id-Dokument ta' Gwida kien ġie ippreparat sabiex jiffaċilita l-għażla ta' proċeduri oħrajn tat-test għall-użu f'ċirkostanzi speċifiċi.

L-assess ta' l-iżvilupp newrotossiku mhux is-suġġett ta' dan il-Metodu.

1.1 INTRODUZZJONI

Fl-assess u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tal-kimika, huwa importanti li jkun ikkonsidrat il-potenzal ta' l-effetti newrotossiċi. Diġa fil-Metodu tat-test dwar tossiċità sistematika għal doża repetuta, jinkludi osservazzjonijiet li jħarsu dwar in-newrotossiċità potenzali. Dan il-Metodu ta' Test jista' jkun użat dabiex jiddisinja studju ħalli jakkwista aktar informazzjoni dwar, jew jikkonferma, l-effetti newrotossiċi, osservati fl-istudji tat-tossiċità sistematika f'doża repetuta. B'dana kollu, kunsiderazzjoni dwar in-newrotossiċità potenzali ta' klassijiet ta' kimika jistgħu jissuġġerixxu li dawn jistgħu ikunu evalwati aħjar bl-użu ta' dan il-metodu mingħajr indikazzjonijiet preċedenti tan-newrotossiċità potenzali minn studji tat-tossiċità sistematika minn doża repetuta. Uħud mill-kunsiderazzjonijiet jinklu, per eżempju:

— l-osservazzjoni ta' sinjali newroloġiċi jew feriti newropatoloġiċi fl-istudji tossiċi apparti milli l-istudji tat-tossiċità sustematika f'doża repetura, jew

— relazzjoni strutturali jew informazzjoni oħra li torbothom ma newrotossikanti magħrufa.

B'żieda jista' jkun hemm okkażżjonijiet oħrajn meta l-użu ta' dan il-metodu ta' test jista' jkun xieraq; għal aktar dettalji ara (1).

Dan il-Metodu kien ġie żviluppat sabiex ikun jista' jiġi mfassal ħalli jilħaq il-ħtiġiet partikolari sabiex jikkonferma l-ħistopatoloġija speċifika u n-newrotossiċità ta' l-imġieba ta' kimika kif ukoll jipprovdi karatterizzazzjoni u kwantifikazzjoni tar-reazzjonijiet newrotossiċi.

▼B

Fil-passat, in-newrotossiċità kienet imqabbla man-newropatija li tinvolvi feriti newropatoloġiċi jew disfunzjonijiet newroloġiċi, bħala ma huma attakk ta' puplesija, paraliżi jew roda. Għalkemm in-newropatija hija manifestazzjoni importanti tan-newrotossiċità, issa huwa ċar li hemm ħafna sinjali oħrajn tat-tossiċità tas-sistema nervuża (eż. it-telf tal-kordinament muturili, it-tnaqqis sensitorju, id-disfunzjonijiet fil-tgħallim u l-memorja) li jistgħu ma jkunux riflessi fl-istudji newropatiċi jew ta' tipi oħrajn.

Dan il-Metodu ta' Test newrotossiku huwa iddisinjat sabiex jiżvela newro-imġieba maġġuri u l-effetti newropatholoġiċi f'annimali gerriema adulti. Waqt l-effetti ta' l-imġieba, anki fin-nuqqas ta' tibdiliet morfoloġiċi, jistgħu jirreflettu fuq l-impatt ħażin ta' l-organiżmi, mhux it-tibdiliet ta' l-imġieba kollha huma speċifiċi għas-sistema nervuża. Għalhekk, xi tibdiliet osservati għandhom ikunu evalwati b'konnessjoni mad-dettalji ħistopatoloġiċi, ħematoloġiċi jew biokemikali korrelattivi kif ukoll l-informazzjoni dwar tipi oħrajn tat-tossiċità sistematika. It-testijiet meħtieġa b'dan il-metodu sabiex jipprovdu karatterizzazzjoni u kwantifikazzjoni tar-reazzjonijiet newrotossiċi jinkludu proċeduri ħistopatoloġiċi jew ta' l-imġieba speċifiċi li jitgħu aktar ikunu appoġġjati minn investigazzjonijiet elettrofiżjoloġiċi u/jew biokimiċi (1) (2) (3) (4).

In-newrotossikanti jistgħu jaġixxu fuq numru ta' miri fi ħdan is-sistema nervuża u b'varjetà ta' mekkaniżmi. La darba l-ebda medda ta' testijiet ma hija kapaċi li tassessja fil-profond il-potenzal newrotossiku tas-sustanzi kollha, jista' jkun meħtieġ li jkunu utilizzati testijiet *in vivo* jew *in vitro* oħrajn speċifiċi għat-tip tan-bewrotossiċità osservata jew antiċipata.

Dan il-Metodu tat-Test jista' jkun użat ukoll, b'konnessjoni malgwida stabbilita fid-Dokument ta' Gwida OECD dwar l-Istrateġiji u l-Metodi tat-testijiet Newrotossiċi (1) li huma iddisinjati bħala intiżi li aktar jikkaratterizzaw jew iżidu s-sensittività tal-kwantifikazzjoni tar-reazzjoni tad-doża sabiex ikun hemm estimi aħjar tal-livell ta' l-effet mhux-osservat-ħażin jew li jissustanzja perikoli magġrufa jew issusspetati tal-kimika. Per eżempju, l-istudji jistgħu ikunu iddisinjati li jidentifikaw u jevaljaw il-mekkaniżmi newrotossiċi jew li jissupplementaw l-informazzjoni diġa disponibbli mill-użu tal-proċeduri bażiċi fl-osservazzjoni newro-imġieba u newropatoloġiċi. Tali studji mhux bilfors li jiddupplikaw l-informazzjoni li tkun ġiet ġenerata mill-użu tal-proċeduri normali rakkommandati f'dan il-metodu jekk tali dettalji jkunu diġa disponibbli u li ma humiex meqjusa bħala meħtieġa għall-interpretazzjoni tar-riżultati ta' l-istudju.

Dan l-istudju newrotossiku, meta użat waħdu jew flimkien ma oħrajn, jipprovdi informazzjoni li tista':

— tidentifika jekk is-sistema nervuża tkun affettwata b'mod permanenti jew riversibbli mill-kimika ittestjata;

— tikkontiribwixxi l-karatterizzazzjoni tat-tibdiliet fis-sistema nervuża assoċċjati ma l-espożizzjoni lejn il-kimika, u dwar ir-rikonoxximent tal-mekkaniżmu bażiku;

▼B

— tiddetermina ir-relazzjoni tad-doża u tar-reazzjoni tal-ħin sabiex ikun ikkalkolat il-livell ta' l-effett ħażin mhux-osservat (li jista' jkun użat sabiex jista'bbilixxi kriterja b'sigurtà għall-kimika).

Dan il-Metodu ta' Test juża amministrazzjoni orali tas-sustanza tat-test. Rotot oħrajn ta' l-amministrazzjoni (eż. dermali jew man-nifs) jistgħu ikunu aktar xierqa, u jistgħu jeħtieġu modifika għall-proċessi rakkommandati. Konsiderazzjonijiet ta' l-għażla tar-rotta ta' l-amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-profil ta' l-espożizzjoni umana u l-informazzjoni disponibbli, tossikoloġika jew kinetika.

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Effett ħażin: Kwalunkwe alterazzjoni relatata mat-trattament minn linja bażi li tnaqqas l-abbiltà ta' l-organiżmu li jibqa ħaj, li jirriproduċi jew li jadatta għall-ambjent.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test kif somministrata. Id-doża hija espressa bħala piż (g. Mg) jew bħala piż tas-sustanza tat-test għal kul unità tal-piż ta' l-annimal tat-test (eż. mg/Kg), jew bħala konċentrazzjonijiet dietarju kostanti 9ppm).

Dożaġġ: Huwa terminu ġenerali li jinkludi d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

Newrotossiċità: Hija it-tibdil ħażin fl-istruttura jew fil-funzjoni tas-sistema nervuża li tirriżulta minn espożizzjoni lejn aġent kimiku, bioloġiku jew fiżiku.

Newrotassikant: Huwa l-aġent kimiku, bioloġiku jew fiżiku li jkollu l-potenzal li joħloq in-newrotossiċità.

NOAEL: Hija l-abbrevjazzjoni għall-livell ta' l-ebda effett avvers ma huwa osservabbli (no-observed-adverse-effect level) u hija l-għola doża jew livell ta' espożizzjoni meta l-ebda sejbiet avversi realatati mat-trattament ma jkunu osservati.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-kimika tat-test hija somministrata bir-rotta orali matul medda ta' dożi lil diversi gruppi ta' annimali gerriema tal-laboratorju. Dożi repetuti huma normalment maħtieġa, u r-regola tad-dożaġġ tista' tkun 18 jum, subkronika (90 jum) jew kronika (sena jew aktar). Il-proċeduri stabbilitu f'dan il-Metodu ta' test jistgħu wkoll ikunu użati għall-istudju tan-newrotossiċità akuta. L-annimali huma ittestjati sabiex jippermettu s-sejbien jew il-karatterizzazzjoni ta' l-imġieba u/jew l-annormalitajiet newroloġiċi. Medda ta' mġieba li tista' tkun affettwata bin-newrotossikanti hija assessjata matul kull perjodu ta' l-osservazzjoni. Fl-aħħar tat-test, subset ta' annimali ta' kull sess minn kull grupp huma mxerrda *in situ* u s-sezzjonijiet tal-moħħ, l-ispina dorsaali, u n-nervi periferali huma ippreparati u eżaminati.

Meta l-istudju jkun imwettaq bħala studju independenti sabiex jevalwa n-newrotossiċità jew li jikkaratterizza l-effetti newrotossiċi, l-annimali f'kull grupp ma li jkunux użati għat-tixrid u l-ħistopatoloġija sussegwenti 9 ara t-Tabella 1) jista' jkun użat għall-proċeduri newro-imġieba speċifika, n-newropatoloġija, in-newrokimika jew elettrofiżjoloġiċi li jistgħu jissuplementaw l-informazzjoni akkwistat mill-eżaminazzjonijiet normali meħtieġa b'daan il-Metodu (1). Dawn il-proċeduri supplementaji jistgħu ikunu partikolarment utili meta l-osservazzjonijiet empiriċi jew l-effetti mistennija jindikaw tip jew mira speċifika tan-newrotossiċità ta' kimika. B'mod alternattiv, il-kumplament ta' l-annimaali jistgħu ikunu użati għal evalwazzjonijiet bħal dawk mitluba fil-Metodi tat-testijiet għal studji tat-tossiċità f'doża repetuta fl-annimali gerriema.

▼B

Meta l-proċeduri ta' dan il-Metodu ta' Test huma miġbura ma dawk tal-metodi ta' testijiet oħrajn, numru suffiċċjenti ta' annimali huwa meħtieġ sabiex jissodisfa l-ħtiġiet għall-osservazzjonijiet taż-żewġ studji.

1.4 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

L-ispeċje preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċje oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Annimali żgħażagħ adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Id-dożaġġ għandu normalment jibda malajr kemm jista' jkun possibbli wara l-ftim, preferibbilemnt mhux aktar tard minn meta l-annimali jkollhom sitt ġimghat, u, fi kwalunkwe każ, qabel ma l-annimali jkunu għalqu d-disa' ġimghat. B'dana kollu, meta dan l-istudju jseħħ flimkien ma studji oħrajn, din il-ħtieġa ta' l-età tista' tkun teħtieġ aġġustament. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati għandha tkun minima u ma teċċedix 20 % tal-piż medju ta' kull sess. Meta studju ta' doża repetita ftul qasir ta' żmien ikun imwettaq bħala preliminarju għal studju f'terminu fit-tul, l-annimali mill-istess tiġ u sorsi għandhom ikunu użati fiż-żewġ studji.

1.4.2 **Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf**

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 ºC (± 3 ºC). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għan għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Ħsejjes għoljin intermittenti għandhom jinżammu għall-anqas possibbli. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata bil-ħtieġa li tkun assigurata inter-taħlita xierqa tas-sustanza tat-test meta somministrata b'dan il-metodu. L-annimali jistgħu jinżammu individwalment jew li jkunu f'gaġġa bħala grupp żgħir ta' l-istess sess.

1.4.3 **Preparazzjoni ta' l-annimali**

Annimali żgħażagħ b'saħħithom ikunu assenjati kif jinzerta għal gruppi ta' trattament u tal-kontroll. Il-gaġġeġ għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minħabba t-tqegħid fil-gaġġeġ ikunu minimizzat. L-annimali huma identifikati b'mod uniku u miżmuma fil-gaġġeġ tagħhom għal mill-anqas (5) ħamest ijiem qabel il-bidu ta' l-istudju sabiex jippermetti għall-akklamitizzazzjoni lejn il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

1.4.4 **Rotta ta' l-amministrazzjoni u l-preparazzjoni tad-doži**

Dan il-Metodu ta' Test juża amministrazzjoni orali tas-sustanza tat-test. L-amminstrazzjoni orali tista' tkun bi tmiegħ sfurzat, ma l-ikel, jew fl-ilma tax-xorb, jew b'kapsuli. Rotot oħrajn ta' l-amministrazzjoni (eż. dermali jew man-nifs) jistgħu ikunu aktar xierqa, u jistgħu jeħtieġu modifika għall-proċessi rakkommandati. Konsiderazzjonijiet ta' l-għażla tar-rotta ta' l-amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-profil ta' l-espożizzjoni umana u l-informazzjoni disponibbli, tossikoloġika jew kinetika. Ir-raġġunar għall-għażla tar-rotta ta' l-aamministrazzjoni kif ukoll il-modifiki li jirriżultaw għall-proċeduri ta' dan il-metodu ta' test għandhom ikun indikati.

▼B

Meta meħtieġ, is-sustanza tat-test tkun imdewwba jew sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkommandat li, kull meta possibbli, l-użu ta' taħlita/-sospenzjoni akwea tkun meqjusa bħala l-ewwel għażla, sewgeita bil-kunsiderazzjoni ta' taħlita/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħirrum) w imbagħad b'xi taħlita oħra f'mezzi oħrajn. Il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz għandhom ikun u magħrufa. B'żieda, kunsiderazzjoni għandha tingħata għal dawn il-karatteristiċi li ġejjin dwar il-mezz: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu joħolqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ima jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.5 PROĊEDURI

1.5.1 **Numru u sess ta' l-annimali**

Meta l-istudju jkun imwettaq bħala studju separat, mill-anqas 20 annimal (10 nisa u 10 irġiel) għandhom ikunu użati għal kull grupp tad-doża u tal-kontroll għall-evalwazzjoni ta' l-osservazzjonijiet dettaljarti kliniċi u funzjonali. Mill-anqas ħamest irġiel u ħames nisa, magħżula minn dawk l-10 tirġiel u l-għaxar nisa, għandhom ikunu mxerrda *in situ* u użati għall-newroħistopatoloġija dettaljata fit-tmiem ta' l-istudju. Fil-każi meta numru limitat biss ta' annimali jkunu mogħti d-doża fil-grupp osservat għas-sinjal ta' l-effetti newrotossiċi, kunsiderazzjoni għandha tkun mogħtija għall-inklużjoni ta' dawn l-annimali f'dawk magħżula għat-tixrid. Meta l-istudju jkun imwettaq flimien ma l-istudju tat-tossiċità ta' doża repetuta, numru adekwat ta' annimali għandu jkun użat sabiex jilħaq l-għanijiet taż-żewġ studju. In-numru minimu ta' annimali f'kull grupp għad-diversi ġemgħat ta' studji huwa mogħti fit-tabella 1. Jekk sa dan it-tant ikun hemm qtil jew gruppi ta' rkupru għall-osservazzjoni tar-riversabbiltà, l-persistenza jew l-okkorrenza mdewma ta' l-effetti tossiċi ta' wara t-trattament, ikunu ippjanati jew meta osservazzjonijiet supplementarji jkunu ikkonsidrati, allura n-numru ta' l-annimali għandu jkun miżjud sabiex jassigura li n-numru ta' l-anniamli meħtieġa għall-osservazzjoni u l-ħistopatoloġija jkunu disponibbli.

1.5.2 **Grupp ta' trattament u tal-kontroll**

Mill-anqas tlett gruppi ta' doża u grupp tal-kontroll għandhom ġeneralment ikunu użati, imma jekk mill-assessjar ta' informazzjoni oħra, l-ebda effetti ma jkunu mistennija fid-doża repetuta ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, tast ta' limitu jkunu jkun imwettaq. Jekk ma jkun hemm l-ebda informazzjoni disponibbli, medda ta' studju tas-sejbien tista' tkun imwettqa sabiex tgħin fid-determinazzjoni tad-doži li għandhom ikunu użati. Apparti milli għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ukoll ikunu mqandla b'manjera identika għas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk ikun użat mezz, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi il-mezz fl-għola volum użat.

1.5.3 **Verifika ta' l-affidabbiltà**

Il-laboratorju li jwettaq l-istudju għandu jippreżenta informazzjoni li turi il-kapaċità tiegħu li jwettaq l-istudju u s-sensittività tal-proċeduri użati. Tali informazzjoni għandha tipprovdi evidenza ta' l-abbiltà li jiżvela u jikkwantifika, kif xieraq, tibdiliet fl-għanijiet finali differenti kif rakkommandati għall-osservazzjoni, bħal ma huma sinjali awtomatiki, reattività sensorja, is-saħħa tal-qabda fid-dirgħajn u s-saqajn u l-attività motorili. L-informazzjoni dwar il-kimika li tikkawża tipi differenti ta' reazzjonijiet newrotossiċi u jistgħu ikunu użati bħala kontroll pożittiv tas-sustanzi jista' jinstgħab fir-referenzi 2 sa 9. L-informazzjoni storika tista' tkun użata jekk l-aspetti essenzali tal-proċeduri. Sperimentali jibqgħu l-istess. Aġġornament perjodiku ta' l-informazzjoni storika huwa rakkommandat. Informazzjoni ġdida li turi s-sensittività kontinwa tal-proċeduri għandha tkun żviluppata meta uħud mill-elementi essenzali ta' l-imġieba tat-test jew tal-proċeduri tkun ġiet mibdula mill-laboratorju li jwettaq l-istudji.

▼B

1.5.4 **L-għażla tad-doża**

Il-livelli tad-doża għandhom ikunu magħżula billi tkun meqjusa xi informazzjoni preċedentament osservata tat-tossiċità u l-kinetika disponibbli għall-kompost tat-test jew tal-materjali relatati. L-għola livell tad-doża għandu jkun magħżul bil-għan li jinduċi effetti newrotossiċi jew effetti ċari sistematikament tossiċi. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħżulha bil-għan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett ħażin mhu osservat (NOAEL). Bħala prinċipju, il-livelli tad-doża għandhom ikunu hekk stabbiliti sabiex primarjament l-effetti tossiċi fuq is-sistema nervuża jistgħu ikunu distingwiti mill-effetti relatati mat-tossiċità sistematika. Tnejn sa erba' intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożi. Meta jkun hemm estimi raġjonevili ta' espożizzjoni umana, dan għandu jkun meqjus.

1.5.5 **Test tal-limitu**

Jekk l-istudju fl-livell ta' doża ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem.kull jum, li juża l-proċeduri deskritti, ma jipproduċi l-ebda effetti newrotossiċi u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija meta ibbażata fuq l-informazzjoni mill-komposti strutturament relatati, allura studju sħiħ li juża tlett livelli ta' dożi jista' li ma jkunx meqjus bħala meħtieġ. L-isposizzjoni umana mistennija tista' tindika il-ħtieġa għal-livell ta' doża orali għola li tkun użata fit-test tal-limitu. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma hija l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza tat-test, bħal kemm tinħall, ta' spiss tista' tindika u tillimita l-livell massimu attenibbli ta' l-espożizzjoni. Għat-twettieq ta' studju akut orali, id-doża tat-test tal-limitu għandha tkun ma mill-anqas 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Amministrazzjoni tad-doża**

L-annimali huma mogħtija d-doża bis-sustanza tat-test, ta' kull jum, sebat ijiet kull ġimgħa, għal perjodu ta' mill-anqas 28 jum; l-użu tar-regola tad-doża ta' ħamest ijiem jew perjodu ta' espożizzjoni aqsar, jeħtieġ li jkunu ġustifikati. Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doża waħda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi inubazzjoni canula xierqa. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wieħed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux jeċċedi 1 ml/100 g piż tal-ġisem. b'dana kollu fil-każ ta' taħlitiet akweji, 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem jista' jkun ikkonsidrat. Apparti milli għal sustanzi irritanti jew korrossivi, li normalment ikununjiżvelaw effetti eżasperanti b'konċentrazzjonijiet għola, varjabbilità fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni sabiex tassigura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

Għal sustanzi amministrati permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, huwa importanti li jkun assigurat li l-kwantitajiet tas-sustanza tat-test kif involuti ma jkunux jinterferixxu man-nutriment normali jew mal-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata fid-dieta, konċentrazzjoni djetarja kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal, jista' jkun użat; il-mod alternattiv użat għandu jkun speċifikat. Għal sustanza somministrata bi tmiegħ sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija f'ħinijiet simili ta' kull jum, u aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa sabiex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Meta l-istudju tad-doża repetuta ikun użat bħala preliminarju għal studju f'terminu fit-tul, dieta simili għandha tkun użata fiż-żewġ studji. F'ċirkostanzi mhuix tas-solti li fihom doża waħda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix l-24 siegħa.

▼B

1.6 OSSERVAZZJONIJIET

1.6.1 **Frekwenza ta' l-osservazzjonijiet u t-testijiet**

Fi studji ta' doża repetuta, il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkopri l-perjodu tad-dożaġġ. Fi studju akuti, perjodu ta' 14-il jum post-trattament, għandu jkun osservat. Għall-annimali fi gruppi satteliti li huma miżmuma mingħajr espożizzjoni matul perjodu tal-post-trattament, l-osservazzjonijiet għandhom ikopru wkoll dan il-perjodu.

L-osservazzjonijiet għandhom isiru fi frekwenza suffiċjenti sabiex iqawwu l-probabbilità tas-sejbien ta' xi annormalitajiet fl-imġieba u/jew fin-newroloġija. L-osservazzjonijiet għandhom, preferibbilment, isiru fl-istess ħinijiet ta' kull jum b'kunsiderazzjoni mogħtija għall-perjodu l-aktar qawwi ta' l-effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-frekwenza ta' l-osservazzjonijiet kliniċi u tat-testijiet funzjonali huma miġbura f'sommarju fit-Tabella 2. Jekk informazzjoni kinetika jew informazzjoni oħra minn studji preċedenti tindika il-ħtieġa ta' l-użu ta' punti differenti tal-ħon, it-testijiet jew il-perjodu post-osservazzjoni, skeda alternattiva għandha tkun adotta sabiex tkun akkwistata l-informazzjoni massima. Ir-raġunar għal tibdil ta' l-iskeda għandu jkun ipprovdut.

1.6.1.1 *Osservazzjonijiet dwar il-kundizzjonijiet ġenerali tas-saħħa u tal-mortalità/morbidità*

L-annimali kollha għandhom ikunu osservati bir-reqqa mill-anqas darba kull jum fir-rigward tal-kundizzjoni tas-saħħa tagħhom kif ukoll mill-anqas darbtejn kull jum dwar il-morbidità u l-moralità.

1.6.1.2 *Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati*

Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru fuq l-annimali kollha magħżula għal dan l-iskop (ara t-Tabella 1), darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex jippermetti għal paraguni fi ħdan is-suġġett), u f'ħinijiet differenti minn hemm il-quddiem, jiddependi mit-tul ta' l-istudju (ara t-Tabella 2). Osservazzjoni kliniċi dettaljati fuq gruppi satellita ta' l-irkupru għandhom isiru fit-tmiem tal-perjodu ta' l-irkupru. Osservazzjoni kliniċi dettaljati għandhom isiru il-barra mill-gaġġa ta' fejn jinżammu f'arena normali. Dawn għandhom ikunu reġistrati bir-reqqa bl-użu ta' sistemi tal-marki li jinkludi kriterja jew skali tal-marki għal kull kejl fl-osservazzjonijiet. Il-kriterja jew l-iskali użati għandhom ikunu spliċitament definiti mil-laboratorju tat-test. Sforz għandu jsir sabiex jassigura li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test ikunu minimi (mhux sistematikament relatati mat-trattament) u li l-osservazzjonijiet ikunu mwettqa minn osservaturi mħarrġa li ma jkunux konxi bit-trattament attwali.

Huwa rakkommandat li l-osservazzjonijiet ikunu mwettqa f'għamla strutturali li fiha kriterja ben definita (inkluża d-definizzjoni tal-"medda" normali) ikunu sistematikament applikati ma kull annimal fuq waqt ta' l-osservazzjon. Il-"medda normali" għandha tkun adekwatament dokumentata. Is-sinjali osservati kollha għandhom ikunu reġistrati. Kull meta prattikabbli, il-magnitudini tas-sinjali osservati għandhom ukoll ikunu rekordjati. L-osservazzjonijiet kliniċi għandhom jinkludu, imma ma jkunx limitati għall-ambjament fil-ġilda, fis-suf, fl-għajnejn, fil-membrani mukoża, fl-okkorrenza tas-sekrazzjonijiet u tal-ħmieġ u l-attività awtomatika

▼B

(eż. lakrimazzjoni, piloerezzjoni, id-daqs tal-pupilla, għamla repiratorja mhux normali u/jew in-nifs mill-ħalq, xi sinjali mhux tas-soltu ta' l-urina jew tal-qlalet, u urina b'kulur stramb). Xi reazzjonijiet mhux tas-soltu fir-rigward tal-pożissjoni tal-ġisem, il-livell ta' l-attività (eż. tnaqqis jew żieda fl-esplorazzjoni fl-arena normali) u l-kordinament tal-moviment, għandhom ukoll ikunu innotati. Tibdil fil-mixi (eż. xengil, atassja), il-posizzjoni (eż. b'darhom mgħawweġ) u r-reattività għat-tqandil, it-tqegħid jew stimulu ambjentali oħraajn, kif ukoll il-preżenta ta' movimenti kloniċi jew toniċi, konvulżjonijiet jew rogħda, stereotipi (eż. kura żejda, movimenti mhux normali tar-ras, dawrien repetittiv) jew imġieba stramba (eż. gdim jew li jilgħaqu b'mod eċċessiv, mutilazzjoni tagħhom stess, mixi lura, vokalizzazzjoni) jew aggressjoni għandhom ikunu rekordjati.

1.6.1.3 *Testijiet funzjonali*

L-istess bħall-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati, it-testijiet funzjonali għandhom ukoll ikunu mwettqa qabel l-espożizzjoni preċedenti u ta' spiss minn hemm il-quddiem fuq l-annimali kollha magħżula għal dan l-iskop (ara t-Tabella 1) Il-frekwenza tat-testijiet funzjonali hija wkoll dipendenti fuq it-tul ta' l-istudju (ara t-Tabella 2). B'żieda mal-perijodi ta' l-osservazzjoni kif elenkati fit-Tabella 2, l-osservazzjonijiet funzjonali fuq gruppi satellita ta' l-irkupru għandhom ukoll isiru malajr kemm jista' jkun possibbli lejn il-qtil tat-terminazzjoni. It-testijiet funzjonali għandhom jinkludu ir-reattività sensitorja għall-istimu ta' diversi modalitajiet, eż. l-istimuli awditorji, viżwali u proprjoseptivi (5)(6)(7)), bl-assaġġ tal-forza tad-dirgħajn u s-saqajn (8) u l-assaġġ ta' l-attività motorili (9). L-attività motorili għandha tkun imkejjla b'apparat awtomatiku li jkun kapaċi jiżvela kemm it-tnaqqis u wkoll iż-żidiet fl-attività. Jekk tkun użata sistema definita oħra, din għandha tkun kwantitattiva u s-sensittività u l-affiddabbilità tagħha għandhom ikunu demonstrati. Kull apparat għandu jkun ittestjat sabiex jassigura affiddabbilità matul iż-żmien u li jkun konsistenti bejn l-apparati. Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu ikunu segwiti huma mogħtija fir-referenzi rispettivi. Jekk ma jkun hemm l-ebda informazzjoni (eż. attività strutturali, dettalji epidemjoloġiċim studju tossikoloġiċi oħrajn(sabiex jindikaw l-effetti newrotossiċi potenzali, l-inklużjoni ta' aktar testijiet speċjalizzati tal-funzjoni sensitorja u motorili jew tat-tgħallim u tal-memorja, sabiex jeżaminaw dawn l-effetti possibbli f'aktar dettall, għandhom ikunu ikkonsidrati. Aktar informazzjoni dwar testijiet speċjalizzati u l-użu tagħhom hija disponibbli fi (1).

B'mod eċċezzjonali, l-annimali li jiżvelaw sinjali ta' tossiċità sal-limitu li din tkun sinifikament tfixkel it-test funzjonali, dawn jistgħu jitħallew barra mit-test. Ġustifikazzjoni għall-eliminazzjoni ta' l-annimali minn test funzjonali għandha tkun ipprovduta.

1.6.2 **Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/ilma**

Għal studju ta' sa 90 jum, l-annimali kollha għandhom ikunu miżuna mill-anqas darba fil-ġimgħa u l-kejl għandu jittieħed tal-konsum ta' l-ikel (konsum ta' l-ilma, meta s-sustanza tat-test hija somministrata b'dik il-medja) mill-anqas darba fil-ġimgħa. Għal studji fit-tul, l-annimali kollha għandhom ikunu miżuna mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull 4 ġimgħat minn hemm il-quddiem. Il-kejl għandu jsir fuq il-konsum ta' l-ikel (il-konsum ta' l-ilma, meta s-sustanza tat-test hija somministrata b'dik il-medja) mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13 il-ġimgħa u imbagħad f'madwar intervalli ta' tlett-xhur, sakemm l-istat tas-saħħa jew tat-tibdiliet fil-piż tal-ġisem jiddettaw mod ieħor.

▼B

1.6.3 **Optalmoloġija**

Għal studji itwal minn 28 jum, l-eżaminazzjoni optalmoloġika, bl-użu ta' optalmoskopju jew strument ekwivalenti addattat, għandha ssir qabel l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test u fit-terminazzjoni ta' l-istudju, preferibbilment fuq l-annimali kollha, imma mill-anqas fuq l-annimali f'doża għolja u l-gruppi ta' kontroll. Jekk tibdiliet fl-għajnejn ikunu żvelati, jew, jekk sinjali kliniċi jindikaw il-ħtieġa, l-annimali kollha għandhom ikunu ezaminati. Għal studji fit-tul, eżaminazzjoni optalmoloġika għandha titwettaq mat-13-il ġimgħa. L-eżaminazzjonijiet optalmoloġiċi ma humiex meħtieġa jekk din l-informazzjoni tkun diġa disponibbli minn studji oħrajn ta' tul simili u f'livelli ta' doża simili.

1.6.4 **Hematoloġija u l-biokemistrija klinika**

Meta l-istudju newrtossiku jkun imwettaq flimkien ma studju tossiku sistematiku b'doża repetuta, l-eżaminazzjonijiet ħematoloġiċi u d-determinazzjoni tal-biokemistrija klinika għandhom jitwattqu kif elenkat fil-Metodu rispettiv ta' l-istudju tossiku sistematiku. Il-ġbir tal-kampjuni għandu jkun imwettaq b'tali mod li xi effetti potenzali fuq in-newro-imġieba jkunu minimizzati.

1.6.5 **Histopatoloġija**

L-eżaminazzjoni newropatoloġika għandha tkun iddisinjata sabiex tikkumplementa u testendi l-opsservazzjonijiet magħmula matul il-fażi *in vivo* ta' l-istudju. Siltiet minn mill-anqas 5 annimali/sess/grupp (ara t-Tabella 1 u l-paragrafu li ġej) għandhom jitwettqu *in situ*, bl-użu ta' perfużjoni ġenerali rikonoxxuta u t-teknika tal-fissazzjoni (ara r-refernza 3, il-kapitolu 5 u r-referenza 4, il-kapitolu 50). Kwalunkwe tibdiliet kbar osservabbli għandhom ikunu irreġistrati. Meta l-istudju jkun imwettaq bħala aspett ta' l-istudju waħdu dwar in-newrotossiċità hew sabiex jikkaratterizza l-effetti newrotossiċi, il-kumplament ta' l-anniamli jistgħu ikunu użati jew għal newro-imġieba speċifika (10) (11), newropatoloġija (10) (11) (12) (13), mewrokimika (10) (11) (14) (15) jew elettropsikoloġija (10) (11) (16) (17), proċeduri li jistgħu jissupplementaw il-proċeduri u l-eżaminazzjonijiet deskritti hemmhekk, jew sabiex iżidu in-numru ta' suġġetti eżaminati għall-ħistopatoloġija. Dawn il-proċeduri supplementaji jistgħu ikunu partikolarment utili meta l-osservazzjonijiet empiriċi jew l-effetti mistennija jindikaw tip jew mira speċifika tan-newrotossiċità ta' kimika. B'mod alternattiv, il-kumplament ta' l-annimali jistgħu wkoll ikunu użati għal evalwazzjoni patoloġiċi ta' rutina kif deskritt fil-Metodu għal studju ta' doża repetuta.

Proċedura ta' tbgħajja ġenerali, bħal ma hija l-ħematossilin u l-eosin (H&E), għandha tkun imwettqa fuq il-kampjuni tal-biċċiet kollha mgħaddsa fil-paraffin, u eżaminazzjoni mikroiskopika għandha tkun imwettqa. Jekk ikunu osservati sinjali ta' newropatija periferali, jew jekk dawn ikunu issusspetati, kampjuni mgħaddsa fil-plastika tan-nisġa tal-nervu periferali, għandha tkun eżaminata. Sinjali kliniċi jistgħu wkoll jissuġġerixxi siti addizzjonali għall-eżaminazzjoni jew l-użu ta' proċeduri speċjali tat-tbgħajja. Gwida dwar siti addizzjonali tista' tinsab fi (3) (4). Tbgħajja speċjali xierqa sabiex jurutipi speċifiċi tat-tibdil patoloġiku jistgħu wkoll ikunu ta' għajnuna (18).

▼B

Sezzjonijiet rappreżentattivi tas-sistema nervuża ċentrali u periferali għandhom ikunu eżaminati b'mod ġistoloġiku (ara r-referenza 3, il-kapitolu 5 u r-referenza 4, il-kapitolu 50). Iż-żoni eżaminati għandhom normalment jinkludu: Il-parti ta' quddiem tal-moħħ, iċ-ċentru tal-cerebrum, inkluża sezzjoni matul il-hippocampus, il-moħħ fin-nofs, il-cerebellum, il-pons, il-medulla oblongata, l-għajnejn bin-nerv ottiku u r-retina, l-ispina dorsali u t-tinfieħ ċervikali u lumbari, il-ganġilja ta' l-għerq dorsali, il-fibri dorsali u vetrali, in-nerv xjatiku prossimali, innerv tibjali prossimati (fl-irkoppa) u n-nerv tibjali fil-friegħi tal-musolu tal-pexxun. L-ispina dorsali u s-sezzjonijiet tan-nervi periferali għandhom jinkludu s-sezzjonijiet laterali jew transversjali u lonġitudinali. Attenzjoni għandha tkun mogħtija għas-sistema vaskulaturali u nervuża. Kampjun tal-muskolu skeletali, partikolarment il-muskolu tal-pexxun, għandu wkoll ikun eżaminat. Attenzjoni speċjali għandha tingħata lis-siti bi struttura ċellullari u fibruża u d-disinn fil-CNS u il-PNS magħrufa li huma partikolarment affettwati bin-newrotossikanti,

Gwida dwar l-alterazzjonijiet newropatologikali li tipikament jirriżultaw minn espożizzjoni tossika jistgħu jinstabu fir-referenzi (3) (4). Eżmai ta' pass b'pass tal-kampjuni tal-biċċiet huwa rakkommandat li fih is-sezzjonijiet minn grupp ta' doża għolja jkunu l-ewwel paragunati ma dawk tal-grupp ta' kontroll. Jekk l-ebda tibdiliet newropatoloġikali ma jkunu osservati fil-kampjuni minn dawn il-gruppi, analiżi sussegwenti ma tkunx meħtieġa. Jekk alterazzjonijiet newropatoloġiċi jkunu osservati fil-grupp ta' doża għolja, il-kampjun minn kull nisġiet potenzalment affettwati, mill-gruppi tad-doża medja jew baxxa, għandhom imbagħad ikunu kodifiklati u sekwenzalment eżaminati.

Jekk xi evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġikali tkun misjuba fl-eżaminazzjoni kwalitattiva, allura it-tieni eżaminazzjoni għandha tkun imwettqa fuq ir-reġjuni kollha tas-sistema nervuża li turi dawn l-alterazzjonijiet. Sezzjonijiet mill-gruppi tad-doži kollha minn kull reġjun potenzalment affettwat għandhom ikunu kodifikati u eżaminati kif jinzerta mingħajr ma tkun magħrufa l-kodiċi. Il-frekwenza u s-severità ta' kull ferita għandha tkun reġistrata. Wara li r-reġjuni kollha mill-gruppi tad-doži kollha jkunu ġew iggradati, il-kodiċi tista' tkun żvelata ul-analiżi statistika mwettqa sabiex tevalwa r-relazzjonijiet doża-reazzjoni. Eżempji tal-gradi differenti tas-severità ta' kull ferita għandhom ikunu deskritti.

Is-sejbiet newroġatoloġiċi għandhom ikunu evalwati fil-kuntest ta' l-osservazzjoni u l-kejl ta' l-imġieba, kif ukoll xi informazzjoni oħra mill-istudji preċedenti u konkorrenti tat-tossiċità sistematika dwar is-sustanza tat-test.

2. **DATA**

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Data ta' l-annimal individwali għandha tkun ipprovduta. B'żieda, l-informazzjoni kollha għandha tkun miġbura f'sommarju, f'għamla tubulati, li turi għal kull test jew għal kull grupp, in-numru ta' l-annimali fil-bisu tat-test, in-numru ta' l-annimali misjuba mejta waqt it-test jew dawk maqtula għal raġunijiet umanitarji, u l-ħin tal-mewt jew tal-qtil umanitarju, in-numru li juru sinjali ta' tassiċità, deskrizzjoni tas-sinjali tat-tossiċità osservati, inkluż il-ħin ta' meta jiskoppjaw, it-tul tal-ħin, it-tip u s-sevirità ta' effetti tossiċi, in-numru ta' l-annimali li jkollhom feriti, inklużi t-tipi u s-severità tal-feriti.

▼B

2.2 EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Is-sejbiet ta' l-istudju għandhom ikunu evalwati f'termini ta' l-inċidenza, severità u korrelazzjoni ta' l-effetti newro-imġieba u newropatoloġiċi (l-effetti bewrokimiċi jew elettrofiżjoloġiċi kif ukoll jekk l-eżaminazzjonijiet supplementari huma nklużi) u xi effetti ħżiena oħrajn li jkunu osservati. Meta possibbli, r-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati bil-metodu xieraq u ġeneralment statistikament aċċettabbli. Il-motodi statistiċi għandhom ikunu magħżula matul id-disinn ta' l-istudju.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1 RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika (inklużi l-propjetajiet iżomeriċi, l-purità u fiżikokimiċi);

— dettalji ta' l-identifikazzjoni.

Mezz (jekk applikabbli):

— il-ġustifikazzjoni tal-mezz użat.

Annimali tat-test:

— speċje/tipi użati;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc;

— il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar is-sustanza tat-test, fomulazzjoni/preparazzjoni tad-dieta, Il-konċentrazzjoni akkwistata, l-istabbilità u l-omoġenità tal-preparazzjoni;

— speċifikazzjonijiet tad-doži amministrati, inklużi d-dettalji tal-mezz, il-volum u l-għamla fiżika tal-materjal amministrat;

— dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;

— ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;

— ir-raġġjonar tar-rotta u t-tul ta' żmien ta' l-espożizzjoni;

— skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-konċentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali (mg/kg il-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Osservazzjoni u proċedura tat-test:

— dettalji ta' l-assenjar ta' l-annimali lejn kull grupp u tat-tixrid tas-sub-gruppi;

— dettalji tas-sistemi tal-marki, inkluża l-kriterja għall-iskali tal-marki dwar kull kejl fl-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati;

▼B

— dettalji dwar it-testijiet funzjonali għar-reattività sensitorja lejn l-istimuli ta' modalitajiet differenti (eż. awditorji, viżwali u proprjoċettivi); għall-assessjar tal-forza tal-qabda tad-driegħ jew tas-sieq; għall-assessjar ta' l-attività motorili (inklużi dettalji ta' apparat awtomatiku sabiex jiżvela l-attività); u l-proċeduri l-oħrajn kif użati;

— dettalji ta' l-eżaminazzjonijiet optalmoloġiċi u, jekk xieraq, l-eżaminazzjonijiet ħematoloġiċi u t-testijiet kliniċi tal-biokemistrija bil-valuri relavanti tal-bidu;

— dettalji għall-proċeduri newroimġieba, newropatoloġija, newrokimika jew elettrofiżjoloġiċi speċifiċi.

Riżultati:

— il-piż tal-ġisem/tibdiliet fil-piż tal-ġisem, inklużi l-piż tal-ġisem mal-qatla;

— il-konsum ta' l-ikel u l-konsum ta' l-ilma, kif xieraq;

— dettalji tar-reazzjoni tossika bis-sess u l-livell tad-doża, inklużi sinjali ta' tossiċità jew mortalità;

— in-natura, is-severità u t-tul ta' żmien (il-waqt ta' meta jiskoppja u l-korsa sussegwenti) ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (sew jekk riversibbli u anki jekk le);

— deskrizzjoni dettaljata tar-riżultati kollha tat-test funzjonali;

— is-sejbiet tan-nekropsija;

— deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha, newroimġieba, newropatoloġikali, u newrokimiċi jew elettrofiżjoloġiċi, jekk disponibbli;

— id-dettalji ta' l-assorbazzjoni u l-metaboliżmu, (jekk disponibbli);

— trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq.

Diskussjoni tar-riżultati:

— informazzjoni dwar ir-reazzjoni mad-doża;

— relazzjoni ma xi effetti tossiċi oħrajn lejn konklużjoni dwar il-potenzal newrotossiku tal-kimika tat-test;

— il-livell ta' l-ebda effett ħazin ma jkun osservat.

Kunklużjonijiet:

— stqarrija speċifika dwar il-globalità newrotossika tal-kimika tat-test hija nkorraġġita.

4. **REFERENZI**

(1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabella 1

Numru minimu ta' annimali meħtieġa għal kull grupp meta l-istudju newrotossiku ikun imwettaq separatament jew flimkien ma studji oħrajn

	STUDJU NEWROTOSSIKU IMWETTAQ BĦALA:			
	Studju separate	Studju flimkien mal-istudju ta' 28 jum	Studju flimkien mal-istudju ta 90 jum	Studju flimkien mal-istudju dwar it-tossiċità kronika
Numru totali ta' l-annimali kull grupp	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	15 maskili u 15 femminili	25 maskili u 25 femminili
Numru ta' annimali magħżula għal testijiet funzjonali, inklużi l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili
Numru ta' annimali magħżula għal kull tixrid *in situ* u n-newroħispatoloġija	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili
Numru ta' annimali magħżula għall-osservazzjonijiet ta' doži tossiċi repetuti/subkroniċi/koroniċi, il-ħematoloġija, il-biokemistrija klinika, il-ħispatoloġija, eċċ., kif indikat fil-Linji ta' Gwida rispettivi.		5 maskili u 5 femminili	10 maskili u 10 femminili †	20 maskili † u 20 femminili †
Osservazzjoni supplementarja, kif xieraq	5 maskili u 5 femminili			

† tinkludi ħames annimali magħżula għall-ittestjar funzjonali u osservazzjonijiet kliniċi bħala parti mill-istudju tan-newrotossiċita

▼B

Tabella 2

Frekwenza ta' l-osservazzjonijiet kliniċi u tat-testijiet funzjonali

Tip ta' l-osservazzjoni		It-tul ta' l-istudju			
		Akut	28-jum	90-jum	Kroniku
L-annimali kollha	Kondizzjoni ġenerali tas-saħħa	Kull jum	Kull jum	Kull jum	Kull jum
	Mortalià/ morbidità	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum
Fl-annimali magħżula għall-osservazzjonij iet funzjonali	Osservazzjonij iet kliniċi dettaljati	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Fi żmien 8 sieġħat mid-doża fl-estimi tal-ħin l-aktar effettiv — Fil-jum 7 u 14 ta' wara d-doża	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fil-ġimgħa minn hem mil-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba matul l-ewwel u t-tieni ġimgħa ta' l-espożizzjoni — Darba fix-xahar minn hemm il-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fit-tmiem ta' l-ewwel xahar ta' l-espożizzjoni — Darba kull tlett xhur, minn hemm il-quddiem
	Testijiet Funz-jonali	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Fi żmien 8 sieġħat mid-doża fl-estimi tal-ħin l-aktar effettiv — Fil-jum 7 u 14 ta' wara d-doża	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Matul ir-raba' ġimgha tat-trat-tament, kemm jista' jkun qrib possibbli lejn it-tmiem tal-perjodu ta' l-espożizzjoni	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba matul l-ewwel u t-tieni ġimgħa ta' l-espożizzjoni — Darba fix-xahar minn hemm il-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fit-tmiem ta' l-ewwel xahar ta' l-espożizzjoni — Darba kull tlett xhur, minn hemm il-quddiem

▼B

B.44. **L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VIVO***

1. **IL-METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 427 (2004).

1.1 DAĦLA

L-espożizzjoni għal ħafna kimiċi ssir l-aktar permezz tal-ġilda filwaqt li l-parti l-kbira ta' l-istudji tossikoloġi mwettqa fuq l-annimali tal-laboratorju jużaw ir-rotta orali ta' l-amministrazzjoni. L-istudju ta' l-assorbiment perkutanju *in vivo* stabbilit f'din il-linja gwida jipprovdi l-kollegament meħtieġ biex jiġi estrapolat mill-istudji orali meta jsiru l-valutazzjonijiet tas-sigurtà wara l-espożizzjoni dermali.

Sustanza trid bilfors taqsam għadd kbir ta' saffi ta' ċelloli tal-ġilda qabel ma tilħaq iċ-ċirkolazzjoni. Il-pass li jiddetermina r-rata għall-parti l-kbira tas-sustanzi huwa l-i*stratum corneum* li jikkonsisti f'ċelloli mejtin. Il-permeabbiltà mill-ġilda tiddependi kemm fuq il-lopofiliċità tal-kimika kif ukoll fuq il-ħxuna tas-saff barrani ta' l-epidermis, ukoll fuq fatturi bħall-piż molekulari u l-konċentrazzjoni tas-sustanza. B'mod ġenerali, il-ġilda tal-firien u tal-fniek hija aktar permeabbli minn dik tal-bnedmin, filwaqt li l-permeabilità tal-ġilda tal-fniek ta' l-indi u tax-xadini hija aktar simili għal dik ta' l-umani.

Il-metodi biex jitkejjel l-assorbiment perkutanju jistgħu jitqassmu f'żewġ kategoriji; *in vivo* u *in vitro*. Il-metodu *in vivo* huwa kapaċi li jipprovdi informazzjoni tajba, f'bosta speċi tal-laboratorju, dwar l-assorbiment mill-ġilda. Aktar reċenti, ġew żviluppati l-metodi *in vitro*. Dawn jużaw it-trasport minn ġilda ta' ħxuna sħiħa jew parzjali ta' l-annimali jew umana lejn kontenitur ta' l-ilma. Il-metodu *in vitro* huwa deskritt f'Metodu tat-Test separat (1). Huwa rrakkomandat li d-Dokument ta' Gwida ta' l-OECD għat-Twettiq ta' l-Istudji dwar l-Assorbiment mill-Ġilda (2) jiġi kkonsultat għall-għajnuna fl-għażla tal-metodu tal-aktar xieraq fis-sitwazzjoni, għaliex jipprovdi aktar dettalji dwar kemm huma xierqa l-metodi *in vivo* u *in vitro*.

Il-metodu *in vivo*, deskritt f'dan il-metodu, jippermetti d-determinazzjoni tal-penetrazzjoni tas-sustanza tat-test mill-ġilda għal ġewwa l-kompartiment sistemiku. It-teknika intużat b'mod mifrux għal ħafna snin (3)(4)(5)(6)(7). Għalkemm l-istudji *in vitro* dwar l-assorbiment perkutanju jistgħu jkunu xierqa f'ħafna każijiet, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn studju *in vivo* biss jista' jipprovdi d-data meħtieġa.

Il-vantaġġi tal-metodu *in vivo* huma li juża sistema li hija fiżjoloġikament u metabolikament intatta, juża speċi li hija komuni għal bosta studji dwar it-tossiċità u jista' jiġi mmodifikat għall-użu ma' speċi oħrajn. L-iżvantaġġ huma li jintużaw annimali ħajjin, il-bżonn ta' materjal li huwa radjotikkettjat biex jiġu ffaċilitati r-riżultati dipendibbli, u d-diffikultajiet fid-determinazzjoni tal-faži ta' l-assorbiment bikri u d-differenzi fil-permeabilità tal-ġilda ta' l-ispeċi preferita (firien) u tal-bniedem. Il-ġilda ta' l-annimali normalment hija aktar permeabbli u għalhekk tista' toħloq stima kbira wisq dwar l-assorbiment perkutanju tal-bniedem (6)(8)(9). Is-sustanzi kawstiċi/korrożivi m'għandhomx jiġu ttestjati fl-annimali ħajjin.

▼B

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Doża mhux assorbita: tirrappreżenta dik maħsula mill-wiċċ tal-ġilida wara l-espożizzjoni u kwalunkwe doża preżenti fuq il-kopertura mhux poruża, inkluża kwalunkwe doża murija li tiżvinta minn fuq il-ġilda matul l-espożizzjoni.

Doża assorbita (*in vivo*): tinkludi dik preżenti fl-urina, fil-ħasil tal-gaggi, fil-feċi, fl-arja skaduta (jekk tiġi mkejla), fid-demm, fiċ-ċelloli (jekk jinġabru) u fil-karkass li jifdal, wara t-tneħħija tal-ġilda tas-sit ta' l-applikazzjoni.

Doża li tista' tiġi assorbita: tirrappreżenta d-doża preżenti fuq jew ġewwa l-ġilda wara l-ħasil.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test, preferibbilment radjotikkettjata, hija applikata fuq il-ġilda mqaxxra ta' annimali f'livell wieħed jew aktar ta' doża xierqa fil-forma ta' preparazzjoni fl-użu rappreżentattiva. Il-preparazzjoni tat-test hija permessa li tibqa' fil-kuntatt mal-ġilda għal perjodu ta' żmien fiss taħt kopertura xierqa (mhux poruża, semi-poruża, jew poruża) biex tiġi mrażżna l-inġestjoni tal-preparazzjoni tat-test. Fl-aħħar tal-ħin ta' l-espożizzjoni l-kopertura titneħħa u l-ġilda titnaddaf b'aġent xieraq tat-tindif, il-kopertura u l-materjali tat-tindif jinżammu għall-analiżi u tiġi provduta kopertura oħra. L-annimali jinżammu qabel, matul u wara l-perjodu ta' l-espożizzjoni f'gaġġi tal-metaboliżmu individwali, u l-ħmieġ u l-arja minfuħa 'l barra f'dawn il-perjodi jinġabru għall-analiżi. Il-ġbir ta' l-arja minfuħa 'l barra jista' jitħalla barra meta hemm biżżejjed informazzjoni li ftit jew xejn metabolit radjoattiv ma jiġi ffurmat. Normalment kull studju jinvolvi bosta gruppi ta' annimali li se jiġu esposti għall-preparazzjoni tat-test. Grupp wieħed jinqatel fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni. Gruppi oħrajn jinqatlu f'intervalli ta' ħin skedati wara dan (2). Fl-aħħar tal-ħin tat-teħid tal-kampjuni l-annimali li jifdal jinqatlu, jinġabar id-demm għall-analiżi, jitneħħa s-sit ta' l-applikazjoni għall-analiżi u l-karkass huwa analiżżat għal materjal li ma ġiex ekskretat. Il-kampjuni huma mogħdija mill-esperiment b'mezzi xierqa u l-livell ta' l-assorbiment perkutanju jiġi stmat (6)(8)(9).

1.4 DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.4.1 **L-għażla ta' l-ispeċi ta' l-annimali**

Il-far huwa l-ispeċi użata l-aktar spiss, iżda fergħat u speċi mingħajr suf li għandhom rati ta' l-assorbiment tal-ġilda aktar simili għal dawk tal-bnedmin, jistgħu jintużaw ukoll (3)(6)(7)(8)(9). Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ u b'saħħithom ta' sess uniku (is-sess normali huwa maskili) ta' fergħat użati ħafna fil-laboratorji. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni tal-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi ± 20 % tal-piż medju. Bħala eżempju, il-firien maskili ta' 200 g – 250 g huma xierqa, b'mod partikolari fl-ogħla nofs ta' din il-firxa.

▼B

1.4.2 **L-għadd u s-sess ta' l-annimali**

Għandu jintuża għal kull preparazzjoni tat-test u għal kull ħin ta' tmiem skedat, grupp ta' mhux inqas minn erba' annimali ta' sess uniku. Kull grupp ta' annimali jinqatel wara intervalli ta' żmien differenti, per eżempju fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni (tipikament 6 sigħat jew 24 siegħa) u fuq okkorrenzi sussegwenti (eż. 48 u 72 siegħa). Jekk hemm data disponibbli li juru differenzi sustanzjali fit-tossiċità dermali bejn il-maskili u l-femminili, għandu jintgħażel is-sess l-aktar sensittiv. Jekk ma hemmx data minn din, jista' jintuża kwalunkwe sess.

1.4.3 **Il-kundizzjonijiet taż-żamma u l-għalf**

It-temperatura fil-kamra ta' l-esperimenti ta' l-annimali għandha tkun ta' 22 ºC (± 3 ºC). Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun għall-inqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % ħlief matul it-tindif tal-kamra, wieħed għandu jimmira lejn 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju u għandhom ikunu liberament disponibbli flimken ma' provvista mingħajr limitu ta' ilma għax-xorb. Matul l-istudju, u preferibbilment ukoll matul l-akklimatizzazzjoni, l-annimali jinżammu individwalment f'gaġeġ tal-metaboliżmu. Ladarba t-twaqqigħ ta' l-ikel u ta' l-ilma jista' jikkompromettі r-riżultati, il-probabbiltà ta' dawn l-okkorrenzi għandha tiġi minimizzata.

1.4.4 **Il-preparazzjoni ta' l-annimali**

L-annimali huma mmarkati biex tkun possibbli l-identifikazzjoni individwali u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għall-inqas għal ħamest ijiet qabel ma jinbeda l-istudju biex tkun possibbli l-akklimatizzazzjoni għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Wara l-perjodu ta' l-akklimatizzazzjoni, u madwar 24 siegħa qabel ma tingħata d-doża, kull animal ikollu parti ta' ġilda fir-reġjun ta' l-ispallejn u d-dar imqaxxra. Il-karatteristiċi ta' permeazzjoni ta' ġilda danneġġjata huma differenti mill-ġilda intatta u għandu jkun hemm attenzjoni li l-ġilda ma tinbaraxx. Wara t-tqaxxir u madwar 24 siegħa qabel ma tiġi applikata s-sustanza tat-test, (ara t-tqsima 1.4.7) il-wiċċ tal-ġilda għandu jintmesaħ bl-aċeton biex jitneħħa s-sebum. Mhijiex rakkomandata ħasla addizzjonali bis-sapun u bl-ilma għaliex ir-residwu tas-sapun jista' jippromwovi l-assorbument tas-sustanza tat-test. Iż-żona għandha tkun kbira biżżejjed biex tippermetti kalkolu dipendibbli ta' l-ammont tal-kimika tat-test asssorbit, preferibbilment għall-inqas 10 $ċm^2$. Din iż-żona hija prattikabbli bil-firien ta' piż tal-ġisem ta' 200-250 g. Wara l-preparazzjoni, l-annimali jiġu ritornati għal-gaġeġ tal-metaboliżmu.

1.4.5 **Is-sustanza tat-test**

Is-sustanza tat-test hija l-entità li l-karatteristiċi tal-permeazzjoni tagħha għandhom jiġu studjati. Idealment, is-sustanza tat-test għandha tiġi radjotikkettjata.

1.4.6 **Il-preparazzjoni tat-test**

Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test (eż. materjal mhux imħallat, imħallat jew ifformulat li fih il-kimika tat-test li hija applikata għall-ġilda(għandha tkun l-istess (jew surrogat realistiku) bħal dik li għalihom jistgħu jkunu esposti l-umani jew speċi oħrajn potenzjali mmirati. Kwalunkwe varjazzjoni mill-preparazzjoni "fl-użu" għandha tkun iġġustifikata. Fejn meħtieġ, is-sustanza tat-test hija maħlula jew sospiża f'kontenitur xieraq. Għal kontenituri minbarra l-ilma, il-karatteristiċi ta' l-assorbiment u l-interazzjoni potenzjali mas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufa.

▼B

1.4.7 **L-applikazzjoni tal-ġilda**

Sit ta' applikazzjoni ta' arja tal-wiċċ speċifika hija ddefinita fuq wiċċ il-ġilda. Ammont magħruf tal-preparazzjoni tat-test huwa mbagħad applikat b'mod uniformi fuq is-sit. Dan l-ammont għandu normalment jimita l-espożizzjoni potenzjali umana, tipikament 1-5 mg/ċm^2 għal solidu jew sa 10 µl/ċm^2 għal-likwidi. Kwantitajiet oħrajn għandhom ikunu ġġustifikati bil-kundizzjonijiet ta' l-użu mistenni, l-għanijiet ta' l-istudju jew il-karatteristiċi fiżiċi tal-preparazzjoni tat-test. Wara l-applikazzjoni, is-sit ittrattat għandu jiġi protett milli jintmess. Eżempju ta' tagħmir tipiku jintwera fil-Figura 1. Normalment, is-sit ta' l-applikazzjoni jiġi protett b'kopertura mhux poruża (eż. għata tal-garża tan-nylon permeabbli). Iżda, għal applikazzonijiet infiniti, is-sit ta' l-applikazzjoni għandu jiġi okkluż. Fil-każ li l-evaporazzjoni ta' sustanzi tat-test semi-volatili jnaqqas ir-rata ta' l-irkupru tas-sustanza tat-test sa livell mhux aċċettabbli (ara wkoll it-taqsima 1.4.1.0, l-ewwel paragrafu), huwa neċessarju li s-sustanza li żvintat tiġi evaporata f'filtru tal-faħam li jkopri t-tagħmir ta' l-applikazzjoni (ara l-Figura 1). Huwa importanti li t-tagħmir ma jagħmilx ħsara lill-ġilda, u lanqas ma jassorbi jew jirreaġixxi mal-preparazzjoni tat-test. L-annimali huma ritornati fil-gaġeġ tal-metaboliżmu individwali sabiex jingħabar il-ħmieġ tagħhom.

1.4.8 **Kemm iddum l-espożizzjoni u t-teħid tal-kampjuni**

Id-dewmien ta' l-espożizzjoni huwa l-intervall bejn l-applikazzjoni u t-tneħħija ta' preparazzjoni bil-ħasil tal-ġilda. Għandu jintuża perjodu rilevanti ta' l-espożizzjoni (tipikament 6 sigħat jew 24 siegħa) fuq bażi tad-dewmien ta' l-espożizzjoni mistennija umana. Wara l-perjodu ta' l-espożizzjoni, l-annimali jinżammu fil-gaġeġ tal-metaboliżmu sat-terminazzjoni kif ippjanat. L-annimali għandhom jiġu osservati għal sinjali ta' tossiċità/reazzjonijiet mhux normali f'intervalli regolari għal kemm idum l-istudju kollu. Flaħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, il-ġilda ttrattata għandha tiġi osservata għal sinjali viżibbli ta' irritazzjoni.

Il-gaġeġ tal-metaboliżmu għandhom jippermettu l-ġbir separat ta' l-urina u l-feċi matul l-istudju kollu. Għandhom jippermettu l-ġbir ta' diossidu tal-karbonju ^{14}C u komposti volatili ta' karbonju ^{14}C, li għandhom jiġu analizzati meta prodotti f'kwantitajiet kbar (> 5 %). L-urina, il-feċi u l-fluwidi intrappolati (eż. diossidu tal-karbonju ^{14}C u komposti volatili ta' ^{14}C) għandhom jingħabru individwalment minn kull gripp fil-ħin tat-teħid tal-kampjuni. Jekk hemm biżżejjed informazzjoni li ftit metabolit radojattiv li jiżvinta, jew xejn, ma jiġi ffurmat, jistgħu jintużaw gaġeġ miftuħin.

Matul il-perjodu ta' l-espożizzjoni, jingħabru l-excreta, sa 24 siegħa wara l-ewwel kuntatt tal-ġilda u mbagħad kuljum sa l-aħħar ta' l-esperiment. Filwaqt li normalment ikunu biżżejjed tliet intervalli tal-ġbir ta' l-excreta, l-għan ippjanat tal-preparazzjoni tat-test jew id-data kinetika eżistenti jistgħu jissuġġerixxu punti ta' żmien addizzjonali għall-istudju.

Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni it-tagħmir protettiv jitneħħa minn kull annimal u jitneħħa minn kull annimal u jinżamm separat għall-analiżi. Jekk il-ġilda ttrattata ta' l-annimali kollha għandha tinħasel għall-inqas 3 darbiet bl-aġent tat-tindif bl-użu ta' tajjar xieraq. Għandu jkun hemm attenzjoni biex jiġi evitat il-kontaminazzjoni ta' partijiet oħrajn tal-ġisem. L-aġent tat-tindif għandu jirrappreżenta l-prattika normali ta' l-iġjene, eż. taħlita tas-sapun bl-ilma. Fl-aħħar, il-ġilda għandha tiġi xxuttata. It-tajjar kollu u l-ħasil kollu għandhom jinżammu għall-analiżi. Għandha tiġi provduta kopertura friska biex is-sit ittrattat ta' dawk l-annimali li jiffurmaw il-gruppi tal-punti ta' ħin ta' wara jiġi protett, qabel ma jittieħdu lura fil-gaġeġ individwali.

▼B

1.4.9 **Il-proċeduri terminali**

Għal kull grupp, l-annimali individwali għandhom jinqatlu fil-ħin ippjanat u d-demm jinġabar għall-analiżi. It-tagħmir jew kopertura protettivi għandhom jitneħħew għall-analiżi. Il-ġilda mis-sit ta' l-applikazzjoni u minn żona simili ta' ġilda mhux iddożata u mqaxxra għandhom jitneħħew minn kull annimali għal analiżi separata. Is-sit ta' l-applikazzjoni jista' jkun frazzjonat biex jiġi sseparat l-i*stratum corneum* mill-epidermis ta' taħt biex tingħata aktar informazzjoni dwar id-dispożizzjoni tal-kimika tat-test. Id-determinazzjoni ta' din id-dispożizzjoni wara l-mogħdija ta' żmien ta' l-espożizzjoni għandha tipprovdi xi indikazzjoni tad-destin ta' kwalunkwe kimika tat-test fl-i*stratum corneum*. Biex tkun faċli l-frazzjonazzjoni tal-ġilda (wara l-aħħar ħasla tal-ġilda u l-qtil ta' l-annimal) kull kopertura protettiva titneħħa. Il-ġilda tas-sit ta' l-applikazzjoni, biċ-ċirku anulari tal-ġilda madwarha, tinqata' minn mal-far u tiġi mwaħħla b'labra fuq biċċa njama. Strixxa ta' tejp tiġi mwaħħla mal-wiċċ tal-ġilda bl-użu ta' pressjoni bil-mod u t-tejp jitneħħa flimkien ma' parti mill-i*stratum corneum*. Jiġu applikati strixxi ta' tejp oħrajn sakemm it-tejp ma jibqax jeħel mal-wiċċ tal-ġilda, meta l-i*stratum corneum* kollu jkun tneħħa. Għal kull animal, l-istrixxi kollha tat-tejp jistgħu jiġu kkombinati f'kontenitur wieħed li mbagħad jiżdied miegħu diġestant tat-tessut biex jissolubilizza l-i*stratum corneum*. Jistgħu jitneħħew tessuti potenzjalment immirati għal kejl separat qabel ma jiġi analiżżat il-karkass residwali għad-doża assorbita tal-karkass. Il-karkassi ta' l-annimali individwali għandhom jinżammu għall-analiżi. Normalment l-organi mmirati jitneħħew għall-analiżi separata (jekk indikat minn studji oħrajn). L-urina preżenti fil-marrara fil-qtil ippjanat għandha tiżdied mal-ġabra ta' l-urina ta' qabel. Wara li jinġabar il-ħmieġ mil-gaġeġ tal-metaboliżmu wara l-qtil fil-ħin ippjanat, il-gaġeġ u l-bibien tagħhom għandhom jinħaslu b'solvent xieraq. Għandu wkoll jiġi analizzat tagħmir ieħor potenzjalment ikkontaminat.

1.4.10 **Analiżi**

Fl-istudji kollha għandu jinkiseb l-irkupru xieraq (jiġifieri medja ta' 100 ± 10 % tar-radjoattività). L-irkupru barra minn din il-firxa għandu jiġi ġġustifikat. L-ammont tad-doża somministrata f'kull kampjun għandu jiġi analizzat fi proċeduri validati kif xieraq.

Il-kunsiderazzjonijiet statistiċi għandhom jinkludu miżura ta' varjanza għar-replikati għal kull applikazzjoni.

2. **DATA**

Dan il-kejl għandu jsir għal kull annimal, f'kull ħin tat-teħid tal-kampjuni għall-kimika tat-test u/jew metabolite. Minbarra d-data individwali, id-data miġbura skond il-ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni għandha tiġi rrapportata bħala medja.

— kwantità assoċjata ma' l-applikazzjonijiet protettivi;

— kwantità li tista' tinqala' minn mal-ġilda;

— kwantità fi/fuq il-ġilda li ma tista'x tinħasel minn mal-ġilda;

▼B

— kwantità fid-demm li ttieħed bħala kampjun;

— kwantità fl-excreta u fl-arja skaduta (jekk xieraq);

— kwantità li jifdal fil-karkass u kwalunkwe organi mneħħi għall-analiżi separata.

Il-kwantità tas-sustanza tat-test u/jew metabolit fil-ħmieġ, fl-arja skaduta, fid-demm u fil-karkass tippermetti d-determinazzjoni ta' l-ammont totali assorbit f'kull punt ta' ħin. Jista' jinkiseb ukoll kalkolu ta' l-ammont ta' kimika tat-test assorbit għal kull $ċm^2$ ta' ġilda esposta għas-sustanza tat-test fil-perjodu ta' l-espożizzjoni.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1 IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport għandu jinkludi r-rekwiżiti stipulati fil-protokoll, inkluża ġustifikazzjoni tas-sistema tat-test użata u għandu tinkludi dawn li ġejjin:

Is-Sustanza tat-Test:

— id-data ta' l-identifikazzjoni [eż. CAS numru, jekk disponibbli; għajn; safa (safa radjokimika); impuritajiet magħrufin; numru tal-lott]

— in-natura fiżika, il-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, solubilità, stabilità, piż molekulari u P_{ow}).

Il-preparazzjoni tat-test:

— formulazzjoni u ġustifikazzjoni ta' l-użu;

— dettalji tal-preparazzjoni tat-test, l-ammont applikat, il-konċentrazzjoni miksuba, il-mezz, l-istabilità u l-omoġeneità.

L-annimal tat-test:

— speċi/fergħa użata;

— numbru, età u sess ta' l-annimali;

— għajn ta' l-annimali, kundizzjonijiet taż-żamma, dieti, eċċ.;

— piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— dettalji ta' l-amministrazzjoni tal-preparazzjoni tat-test (sit ta' l-applikazzjoni, metodi ta' l-esperiment, porożità/nuqqas ta' porożità, volum, estrazzjoni, skoperta);

— dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Riżultati:

— sinjali ta' tossiċità;

— data tabulata dwa l-assorbiment (espresso bħala rata, ammont jew persentaġġ);

▼B

— irkupri totali ta' l-esperiment;

— interpretazzjoni tar-riżultati, tqabbil ma' data disponibbli jew assorbiment perkutanju tal-kompost tat-test.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

1. Metodu tat-Test B.45. L-Assorbiment tal-Ġilda: Metodu *In vitro*

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. J. *Am. Coll. Toxicol*. 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

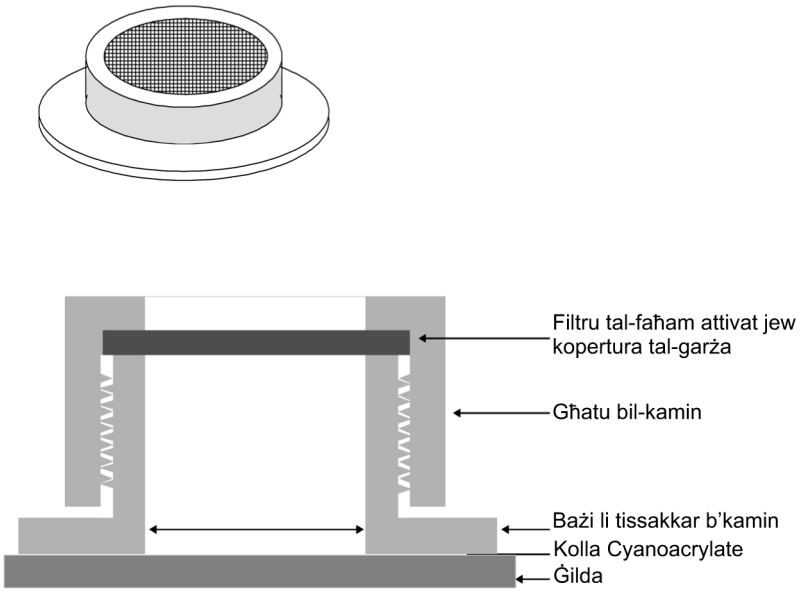
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic*. 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol*. 54, 399-404.

▼B

Figura 1

Eżempju ta' Diżinn ta' Tagħmir Tipiku użat biex jiġi Definit u Protett Sit ta' l-Applikazzjoni Dermali matul Studji *in vivo* ta' l-Assorbiment Perkutanju



▼B

B.45. **L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VITRO***

1. **IL-METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 428 (2004).

1.1 DAĦLA

Dan il-Metodu ġie ddiżinjat biex jipprovdi informazzjoni dwar l-assorbiment ta' sustanza tat-test applikata għall-ġilda maqtugħa barra. Jista' jiġi kkombinat mal-Metodu għall-Assorbiment tal-Ġilda: Il-Metodu *In vivo* (1), jew isir separatament. Huwa rrakkomandat li d-Dokument ta' Gwida ta' l-OECD għat-Twettiq ta' l-Istudji dwar l-Assorbiment mill-Ġilda (2) jiġi kkonsultat għall-għajnuna fid-disinn ta' l-istudji bbażati fuq dan il-Metodu. Id-Dokument ta' Gwida ġie ppreparat biex jiffaċilita l-għażla ta' proċeduri *in vitro* xierqa għall-użu f'ċirkostanzi speċifiċi, biex tiġi żgurata d-dependibbiltà tar-riżultati miksuba b'dan il-metodu.

Il-metodi biex jitkejjel l-assorbiment perkutanju jistgħu jitqassmu f'żewġ kategoriji; *in vivo* u *in vitro*. Il-metodi *in vivo* dwar l-assorbiment tal-ġilda huma stabbiliti sew u jipprovdu informazzjoni farmakokinetika f'firxa ta' speċje ta' l-annimali. Il-metodu *in vivo* huwa deskritt separatament f'Metodu tat-Test ieħor (1). Il-metodi *in vitro* ukoll intużaw għal bosta snin biex jitkejjel l-assorbiment tal-ġilda. Għalkemm l-istudji tal-validazzjoni formali tal-metodi *in vitro* koperti b'dan il-Metodu tat-Test ma sarux, l-esperti ta' l-OECD qablu fl-1999 li kien hemm biżżejjed data evalwata biex issostni l-metodu *in vitro* (3). Aktar dettalji li jissostanzjaw dan is-sostenn, inkluż għadd sinjifikanti ta' paraguni diretti tal-metodi *in vitro* u *in vivo,* jingħataw mad-Dokument ta' Gwida (2). Hemm għadd ta' monografi li jeżaminaw dan is-suġġett u jagħtu sfond dettaljat dwar l-użu ta' metodu *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Il-metodi *in vitro* jkejlu d-diffużjoni tal-kimika fi u minn ġo l-ġilda lejn kontenitur tal-fluwidu u jistgħu jużaw ġilda mhux vijabbli biex ikejlu d-diffużjoni biss, jew ġilda attiva, metabolikament attiva, biex fl-istess ħin ikejlu d-diffużjoni u l-metaboliżmu tal-ġilda. Dawn il-metodi nstabu partikolarment utli bħala skrin għat-tqabbil tat-twassil tal-kimika fi u minn ġo l-ġilda minn formolazzjonijiet differenti u jistgħu wkoll jipprovdu mudelli utli għall-istima ta' l-assorbiment perkutanju mill-ġilda.

Il-metodu *in vitro* jista' ma jgħoddx għas-sitazzjonijiet kollha jew għall-klassijiet kollha tal-kimiċi. Jista' jkun possibbli li jintuża l-metodu tat-test *in vitro* għall-evalwazzjoni kwalitattiva inizzjali tal-penetrazzjoni tal-ġilda. F'xi każijiet jista' jkun meħtieġ li mbagħad ikun hemm id-data *in vivo*. Id-dokument ta' gwida (2) għandu jiġi kkonsultat għal aktar elaborazzjoni ta' sitwazzjonijiet fejn ikun xieraq il-metodu *in vitro*. Informazzjoni addizzjonali dettaljata biex tiġi sostnuta d-deċiżjoni tingħata f'(3).

Dan il-metodu jippreżenta l-prinċipji ġenerali biex jitkejjel l-assorbiment dermali u t-twassil tas-sustanza tat-test bl-użu tal-ġilda maqtugħa barra. Tista' tintuża l-ġilda minn bosta speċje mammiferi, inklużi l-bnedmin. Il-karatteristiċi tal-permeabilità tal-ġilda jinżammu wara li tinqata' minn mal-ġilda għaljiex l-ostakolu prinċipali tad-diffużjoni huwa l-i*stratum corneum* mhux vijabbli; it-trasport attiv tal-kimika mill-ġilda ma ġiex identifikat. Il-ġilda ntweriet li għandha l-kapaċità li timmetabolizza xi kimika matul l-assorbiment perkutanju (6), iżda dan il-proċess ma jillimitax ir-rata f'termini ta' doża attwalment assorbita, għalkemm jista' jaffettwa n-natura ta' materjal li daħlet fis-sistema tad-demm.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Doża mhux assorbita: tirrappreżenta dik maħsula mill-wiċċ tal-ġilida wara l-espożizzjoni u kwalunkwe doża preżenti fuq il-kopertura mhux poruża, inkluża kwalunkwe doża murija li tiżvinta minn fuq il-ġilda matul l-espożizzjoni.

Doża assorbita (*in vitro*): massa tas-sustanza tat-test li tilħaq il-fluwidu reċettur jew iċ-ċirkolazzjoni sistemika f'ħin speċifikat.

Doża li tista' tiġi assorbita (*in vitro*): tirrappreżenta d-doża preżenti fuq jew ġewwa l-ġilda wara l-ħasil.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test, li tista' tkun radjotikkettjata, hija applikata fuq il-wiċċ ta' kampjun tal-ġilda li jissepara żewġ kompartimenti ta' ċellola tad-diffużjoni. Il-kimika tibqa' fuq il-ġilda għal żmien speċifikat taħt kundizzjonijiet speċifikati, qabel ma titneħħa bi proċedura xierqa tat-tindif. Jittieħed kampjun tal-fluwidu reċettorju f'punti matul l-esperiment u jiġi analizzat għall-kimika tat-test u/jew metaboliti.

Meta jintużaw sistemi metabolikament attivi, il-metaboliti tal-kimika tat-test jistgħu jiġu analizzati b'metodi xierqa. Fl-aħħar ta' l-esperiment, id-distribuzzjoni tal-kimika tat-test u l-metaboliti tagħha jiġu kkwantifikat, meta jkun xieraq.

Bl-użu ta' kundizzjonijiet xierqa, li huma deskritti f'dan il-metodu u fid-dokument ta' gwida (2), l-assorbiment ta' sustanza tat-test matul terminu definit jitkejjel bl-analiżi tal-fluwidu reċettorju u tal-ġilda ttrattata. Is-sustanza tat-test li jifdal fil-ġilda għandha titqies bħala assorbita mill-valuri tal-fluwidu reċettorji waħdu. L-analiżi tal-komponenti oħrajn (materjal maħsul minn mal-ġilda u li jifdal fis-saffi tal-ġilda) tippermetti evalwazzjoni ulterjuri tad-data, inkluża d-dispożizzjoni totali tas-sustanza tat-test u l-perċentwal ta' l-irkupru.

Biex jintwera l-operat u d-dipendibbiltà tas-sistema tat-test fil-laboratorju tal-ħidma, ir-riżultati għall-kimiċi rilevanti ta' referenza għandhom ikunu disponibbli u bi qbil mal-letteratura pubblikata għall-metodu użat. Dan ir-rekwiżit jista' jintlaħaq billi tiġi ttestjata sustanza xierqa ta' riferenza (preferibbilment ta' lipofiliċità qrib is-sustanza tat-test) b'mod konkurrenti mas-sustanza tat-test jew bil-proviżon ta' data storika xierqa għal għadd ta' sustanzi ta' riferenza ta' lipofiliċità differenti (eż. il-kaffeina, l-aċidu benżoiku, u t-testosterone).

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **Iċ-ċellola tad-diffużjoni**

Ċellola tad-diffużjoni tikkonsisti f'kompartiment donatur u kompartiment reċettorju li bejniethom titqiegħed il-ġilda (eżempju ta' diżinn tipiku huwa provdut fil-Figura 1). Iċ-ċellola għandha tipprovdi siġill tajjeb madwar il-ġilda, tippermetti t-teħid faċli tal-kampjuni u taħlit tajjeb tat-taħlita reċettorja f'kuntatt mal-parti ta' taħt tal-ġilda, u l-kontroll tajjeb tat-temperatura taċ-ċellola u l-kontenut tagħha. Iċ-ċelloli statiċi u li jippermettu d-diffużjoni bit-tnixxija huma t-tnejn aċċettabbli. Normalment, il-kompartimenti donaturi jitħallew mhux poruži matul l-espożizzjoni għal doża tal-preparazzjoni tat-test. Madankollu, għal applikazzjonijiet infiniti u għal xi xenarji għal dożi finite, il-kompartimenti donaturi jistgħu jkunu poruži.

▼B

1.4.2. **Il-fluwidu reċettorju**

L-użu ta' fluwidu reċettorju fiżjoloġikament konduċiv huwa preferit għalkemm jistgħu jintużaw kemm-il darba huma ġġustifikati. Il-kompożizzjoni preċiża tal-fluwidu reċettorju għandha tkun provduta. Is-solubilità xierqa tal-kimika tat-test fil-fluwidu reċettorju għandha tintwera sabiex ma taġixxix bħala ostakolu għall-assorbiment. Barra minn hekk, il-fluwidu reċettorju m'għandux jaffettwa l-integrità tal-preparazzjoni tal-ġilda. F'sistema tat-tnixxija, ir-rata tat-tnixxija m'għandhiex tostakola d-diffużjoni ta' sostanza tat-test fil-fluwidu reċettorju. F'sistema ta' ċelloli statiċi, il-fluwidu għandu jiġi mħawwad kontinwament u jittieħdu l-kampjuni regolarment. Jekk il-metaboliżmu qed jiġi studjat, il-fluwidu reċettorju għandu jsostni l-vijabilità tal-ġilda tul l-esperiment kollu.

1.4.3 **Il-preparazzjonijiet tal-ġilda**

Tista' tintuża ġilda minn għejun umani jew ta' l-annimali. Huwa rikonoxxut li l-użu tal-ġilda umana huwa soġġett għal kunsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali. Għalkemm hija preferuta ġilda vijabbli, tista' tinuża wkoll ġilda mhux vijabbli kemm-il darba l-integrità tal-ġilda tista' tintwera. Huma aċċettabbli membrani epidermali (separati enżimikament, bis-sħana jew kimikament) jew ġilda ta' ħxuna maqsuma (tipikament ħoxna daqs 200-400 μm) ippreparati b'dermatome. Tista' tintuża ġilda ta' ħxuna sħiħa iżda l-ħxuna eċċessiva *(*ca. > 1 mm) għandha tiġi evitata kemm-il darba mhijiex speċifikament meħtieġa għad-determinazzjoni tal-kimika tat-test fis-saffi tal-ġilda. L-għażla ta' l-ispeċje, tas-sit anatomiku u tat-teknika preparattiva għandhom ikunu ġġustifikati. Id-data aċċettabbli minn minimu ta' erba' replikati għal kull preparazzjoni tat-test hija meħtieġa.

1.4.4 **L-integrità tal-Preparazzjoni tal-Ġilda**

Huwa essenzjali li l-ġilda hija ppreparata sew. L-immaniġġjar mhux xieraq jista' jirriżulta f'dannu lill-i*stratum corneu*m, u għalhekk l-integrità tal-ġilda ppreparata għandha tiġi ċċekkjata. Meta jiġi investigat il-metaboliżmu tal-ġilda, il-ġilda maqtugħa barra friska għandha tintuża mill-aktar fis possibbli, u taħt kundizzjonijiet magħrufa li jsostnu l-attività metabolika. Bħala gwida ġenerali, il-ġilda maqtugħa barra friska għandha tintuża fi żmien 24 siegħa, iżda l-perjodu aċċettabbli tal-ħażna jista' jvarja skond is-sistema ta' l-enżimi involuti fil-metabolizzazzjoni u t-temperaturi tal-ħażna (13). Meta l-preparazzjonijiet tal-ġilda jkunu nħażnu qabel ma jintużaw, għandha tingħata prova biex turi li l-funzjoni ta' ostakolu nżammet.

1.4.5 **Is-sustanza tat-test**

Is-sustanza tat-test hija l-entità li l-karatteristiċi tal-permeazzjoni tagħha għandhom jiġu studjati. Idealment, is-sustanza tat-test għandha tiġi radjotikkettjata.

1.4.6 **Il-preparazzjoni tat-test**

Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test (eż. materjal mhux imħallat, imħallat jew ifformulat li fih il-kimika tat-test li hija applikata għall-ġilda għandha tkun l-istess (jew surrogat realistiku) bħal dik li għalihom jistgħu jkunu esposti l-umani jew speċje oħrajn potenzjali mmirati. Kwalunkwe varjazzjoni mill-preparazzjoni "fl-użu" għandha tkun iġġustifikata.

▼B

1.4.7 **Il-Konċentrazzjonijiet u l-Formulazzjonijiet tas-Sustanzi tat-Test**

Normalment tintuża aktar minn konċentrazzjoni waħda li hija mifruxa fuq l-ogħla espożizzjonijiet potenzjali umani. Bl-istess mod, għandu jitqies l-ittestjar ta' firxa ta' formulazzjonijiet tipiċi.

1.4.8 **L-applikazzjoni tal-ġilda**

Taħt kundizzjonijiet normali ta' espożizzjoni umana għall-kimika, normalment ikun hemm dożi finiti. Għalhekk, għandha titntuża applikazzjoni li timita l-espożizzjoni umana, normalment 1-5 mg/cm^2 ġilda għal solidu u sa 10 µl/cm2 għal-likwidi. Il-kwantità għandha tkun ġustifikata mill-kundizzjonijiet ta' l-użu mistenni, mill-għanijiet ta' l-istudju jew mill-karatteristiċi tal-preparazzjoni tat-test. Per eżempju, l-applikazzjonijiet għall-wiċċ tal-ġilda jistgħu jkunu infiniti, fejn huma applikati volumi kbar għal kull żona ta' unità.

1.4.9 **Temperatura**

Id-diffużjoni passiva tal-kimiċi (u għalhekk l-assorbiment tagħhom mill-ġilda) hija affettwata mit-temperatura. Il-kompartiment tad-diffużjoni u l-ġilda għandhom jinżammu f'temperatura kostanti qrib dik normali tal-ġilda ta' 32+/-1 ºC. Diżinji differenti taċ-ċelloli jeħtieġu temperaturi differenti tal-banju ta' l-ilma jew tal-blokka msaħħna sabiex jiġi żgurat li r-reċettur/ġilda ikun/tkun fin-norma fiżjoloġika. L-umdità għandha preferibbilment tkun bejn it-30 u s-70 %.

1.4.10 **Kemm iddum l-espożizzjoni u t-teħid tal-kampjuni**

L-espożizzjoni tal-ġilda għall-preparazzjoni tat-test tista' tkun għal kemm idum l-esperiment jew għal termini iqsar (jiġifieri, biex tiġi imitata espożizzjoni umana ta' tip speċifiku). Il-ġilda għandha tinħasel mill-preparazzjoni tat-test żejda b'aġent tat-tindif rilevanti, u t-tlaħliħ jinġabar għall-analiżi. Il-proċedura tat-tneħħija tal-preparazzjoni tat-test tiddependi fuq il-kundizzjoni ta' l-użu mistenni, u għandha tiġi ġustifikata. Normalment huwa meħtieġ perjodu tat-teħid tal-kampjuni ta' 24 siegħa biex tkun possibbli l-karatterizzazzjoni xierqa tal-profil ta' l-assorbiment. Ladarba l-integrità tal-ġilda tista' tibda tiddeterjora wara 24 siegħa, il-ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni normalment m'għandhomx jeċċedu 24 siegħa. Għas-sustanzi tat-test li jippenetraw il-ġilda malajr, dan jista' ma jkunx meħtieġ, iżda, għas-sustanzi tat-test li jippenetraw bil-mod, jistgħu jkunu meħtieġa perjodi itwal. Il-frekwenza tat-teħid tal-kampjuni tal-fluwidu reċettorju għandha tippermetti lill-profil ta' l-assorbiment tas-sustanza tat-test jiġi ppreżentat grafikament.

1.4.11 **Il-proċeduri terminali**

Il-komponenti kollha tas-sistema tat-test għandhom jiġu analizzati u l-irkupru għandu jiġi determinat. Dan jikludi l-kompartiment donator, it-tlaħliħ tal-wiċċ tal-ġilda, il-preparazzjoni tal-ġilda u l-fluwidu/-kompartiment reċettorju. F'xi każijiet, il-ġilda tista' tiġi frazzjonata fil-parti esposta tal-ġilda u l-parti tal-ġilda taħt il-flanġa tal-ġilda, u fl-i*stratum corneu*m, l-epidermis u l-frazzjonijiet tad-dermis, għall-analiżi separata.

1.4.12 **L-analiżi**

Fl-istudji kollha għandu jinkiseb l-irkupru xieraq (il-mira għandha tkun medja ta' 100+/-10 % tar-radjoattività u kwalunkwe devjazzjoni għandha tkun iġġustifikata). L-ammont tas-sustanza tat-test fil-fluwidu reċettorju, fil-preparazzjoni tal-ġilda, fil-ħasil tal-wiċċ tal-ġilda u fit-tlaħliħ ta' l-apparat għandu jiġi analizzat, bl-użu ta' teknika xierqa.

▼B

2. **ID-DATA**

L-analiżi tal-fluwidu reċettorju, id-distribuzzjoni tal-kimika tas-sustanza tat-test fis-sistema tat-test u l-profil ta' l-assorbiment mal-ħin, għandhom jiġu ppreżentati. Meta jintużaw kundizzjonijiet ta' l-espożizzjoni għal dożi finita, il-kwantità maħsula mill-ġilda, il-kwantità assoċjataa mal-ġilda (u f'saffi differenti tal-ġilda jekk analizzata) u l-ammont preżenti fil-fluwidu reċettorju (rata, u l-ammont jew perċentwal tad-doża applikata) għandhom jiġu kkal-kolati. L-assorbiment mill-ġilda jista' kultant jiġi espress bl-użu tad-data tal-fluwidu reċettorju biss. Madankollu meta s-sustanza tat-test tibqa' fil-ġilda fl-aħħar ta' l-istudju, jista' jkun meħtieġ li tiġi inkluża fl-ammont totali assorbit (ara l-paragafu 66 fir-referenza (3)). Meta jintużaw kundizzjonijiet ta' dożi infiniti ta' espożizzjoni id-data tista' tippermetti l-kalkolu ta' kostant tal-permeabilità (Kp). Taħt dawn il-kundizzjonijiet ta' l-aħħar, il-perċentwal assorbit mhuwiex rilevanti.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport għandu jinkludi r-rekwiżiti stipulati fil-protokoll, inkluża ġustifikazzjoni tas-sistema tat-test użata u għandu tinkludi dawn li ġejjin:

Is-Sustanza tat-Test:

— in-natura fiżika, il-karatteristiċi fiżikokimiċi (għall-inqas il-piż molekulari u log P_{ow}), safa (safa radjokimika);

— informazzjoni ta' l-identifikazzjoni (eż. lott numru);

— solubilità fi fluwidu reċettorju.

Il-preparazzjoni tat-test:

— formulazzjoni u ġustifikazzjoni ta'l-użu;

— omoġeneità.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

— għejun u s-sit tal-ġilda, il-metodu tal-preparazzjoni, il-kundizzjonijiet tal-ħażna qabel l-użu, kwalunkwe trattament qabel (tindif, trattament antibjotiku, eċċ), kejl ta' l-integrità tal-ġilda, stat metaboliku, ġustifikazzjoni ta' l-użu;

— diżinn taċ-ċelloli, kompożizzjoni tal-fluwidu reċettorju, rata tat-tnixxija tal-fluwidu jew ħinijiet u proċeduri tat-teħid tal-kampjuni;

— dettalji ta' l-applikazzjoni f test tal-preparazzjoni tat-test u l-kwantifikazzjoni tad-doża applikata;

— kemm iddum l-espożizzjoni;

— dettalji tat-tneħħija tal-preparazzjonijiet mill-ġilda, eż. tlaħliħ tal-ġilda;

— dettalji ta' l-analiżi tal-ġilda u kwalunkwe teknika tal-frazzjon-azzjoni użata biex tintwera d-distribuzzjoni tal-ġilda;

▼B

— proċeduri tal-ħasil taċ-ċelloli u tat-tagħmir;

— metodi ta' l-esperimenti, tekniċi ta' l-estrazzjoni, limiti ta' l-iskoperta u validazzjoni analitika tal-metodu.

Riżultati:

— irkupru totali ta' l-esperiment (Doża applikata ≡ Ħasil tal-ġilda + Ġilda + Fluwidu reċettur + Ħasil taċ-Ċelloli);

— tabulazzjoni ta' l-irkupru individwali taċ-ċelloli f'kull kompartiment;

— profil ta' l-assorbiment;

— data tabulata dwar l-assorbiment (espressa bħala rata, ammont jew perċentwal).

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

1. Metodu tat-Test B.44. L-Assorbiment tal-Ġilda: Metodu *In vivo*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2 000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Application*s. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussel.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et a*l. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

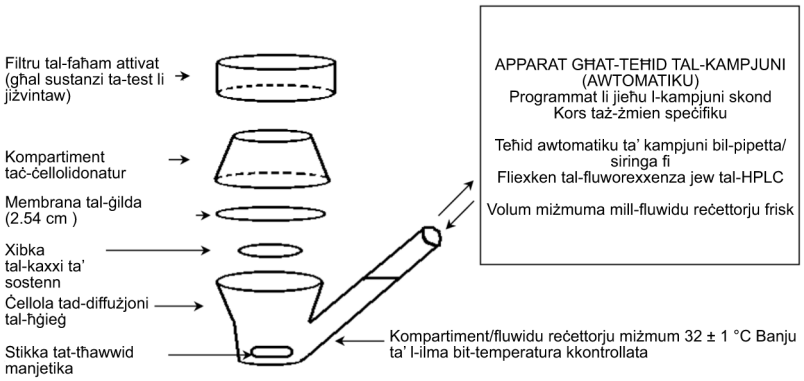
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Eżempju ta' Diżinn Tipiku ta' Ċellola tad-Diffużjoni Statika għall-Istudji *in vitro* ta' l-Assorbiment Perkutanju



▼M3

B.46. IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-EPIDERMIDE UMANA RIKOSTRUWITA

INTRODUZZJONI

1. Irritazzjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara riversibbli fil-ġilda wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal massimu ta' 4 siegħat [kif iddefinit mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS —Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) u mir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet (1)(3)]. Dan il-Metodu ta' Ttestjar (TM) jipprovdi proċedura *in vitro* li tista' tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi kimiċi irritanti (sustanzi u taħlitiet) f'konformità mal-GHS tan-NU u l-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE (1) (2) (3). Fl-UE u f'reġjuni oħra, li ma adottawx il-Kategorija 3 (sustanzi irritanti minuri) tal-GHS tan-NU, dan it-TM jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi mhux klassifikati, jiġifieri dawk ta' "L-Ebda Kategorija" fil-GHS tan-NU u fis-CLP tal-UE (1)(3). Dan it-TM jista' jintuża sabiex jiddetermina l-irritazzjoni fuq il-ġilda tas-sustanzi kimiċi bħala test sostitut waħdieni għall-ittestjar ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vivo* fi ħdan strateġija ta' ttestjar imtarrġa (il-Kapitolu 4 u l-Kapitolu B.4 f'dan l-Anness).

2. Ġeneralment, il-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu tal-annimali tal-laboratorju [il-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD; il-Kapitolu B.4 f'dan l-Anness] (4). Fir-rigward tal-kwistjonijiet relatati mal-benesseri tal-annimali, il-B.4 ġie rivedut fl-2004 u sar jippermetti li tiġi ddeterminata l-korrużjoni/irritazzjoni tal-ġilda billi tiġi applikata strateġija ta' ttestjar imtarrġa, billi jintużaw metodi ta' ttestjar *in vitro* jew *ex vivo*, u għalhekk jiġu evitati l-uġigħ u t-tbatija tal-annimali. Tliet metodi ta' ttestjar *in vitro* validati ġew adottati bħala Linji Gwida 430, 431 u 435 (5) (6) (7) tat-Test tal-OECD u tnejn minnhom bħala l-Kapitoli B.40 u B.40bis ta' dan l-Anness, li għandhom jintużaw għall-parti korrużiva tal-istrateġija ta' ttestjar imtarrġa tal-B.4 jew tal-Linja Gwida (4) tat-Test tal-OECD.

3. Dan it-TM jindirizza l-irritazzjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmiem tas-saħħa umana. Huwa bbażat fuq epidermide umana rikostruwita (RhE— Reconstructed human Epidermis), li fid-disinn globali tagħha (l-użu tal-keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-epidermide umana bħala sors taċ-ċelloli u l-użu ta' tessut u ċitoarkitettura rappreżentattivi) tixbah ħafna lill-karatteristiċi bijokimiċi u fiżjoloġiċi tas-saffi tal-wiċċ tal-ġilda umana, jiġifieri l-epidermide. Dan it-TM jinkludi wkoll sett ta' Standards ta' Prestazzjoni (Appendiċi 2) għall-valutazzjoni ta' metodi simili u modifikati bbażati fuq l-RhE żviluppati mill-EC-ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) (8), f'konformità mal-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida Nru 34 tal-OECD (9).

4. Hemm tliet metodi validati li jaderixxu ma' dan it-TM. L-istudji ta' prevalidazzjoni, l-ottimizzazzjoni u l-validazzjoni tlestew għal metodu *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), li jużaw mudell tal-RhE, disponibbli kummerċjalment bħala EpiSkin™ (iddeżinjat il-Metodu ta' Referenza Validat — VRM — Validated Reference Method). Żewġ metodi oħra tal-RhE kummerċjalment disponibbli ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* wrew riżultati simili għall-VRM skont il-validazzjoni bbażata fuq il-PS (21), u dawn huma l-metodi ta' EpiDerm™ SIT (EPI-200) u ta' SkinEthic™ RHE (22).

▼M3

5. Qabel ma jkun jista' jintuża metodu RhE *in vitro* simili jew modifikat propost għajr il-metodi tal-RHE ta' VRM, ta' EpiDerm™ SIT (EPI-200) jew ta' SkinEthic™ RHE għal skopijiet regolatorji, għandhom jiġu stabbiliti l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni) u l-limitazzjonijiet tiegħu għall-użu maħsub sabiex jiġi żgurat li dan jista' jitqies bħala wieħed simili għal dak tal-VRM, skont ir-rekwiżiti tal-PS stabbiliti f'dan it-TM (Appendiċi 2). Barra minn hekk, huwa rakkomandat li jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Sfond ta' Spjegazzjoni tal-OECD dwar l-ittestjar ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* qabel l-iżvilupp u l-validazzjoni ta' metodu RhE *in vitro* simili jew modifikat u qabel ma dan jiġi sottomess għal adozzjoni regolatorja (23).

DEFINIZZJONIJIET

6. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Limitazzjoni tat-TM, kif muri mill-istudju ta' validazzjoni (16), huwa li dan ma jippermettix il-klassifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi għall-Kategorija 3 (sustanzi irritanti minuri) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1). Meta jintuża bħala test sostitut parzjali, jista' jkun meħtieġ ittestjar *in vivo* ta' segwitu sabiex jiġi karatterizzat il-potenzjal sħiħ ta' irritazzjoni tal-ġilda (il-Kapitolu 4 u l-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Huwa rikonoxxut li l-użu ta' ġilda umana huwa soġġett għal konsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.

8. Dan it-TM jindirizza l-komponent ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* tal-istrateġija ta' ttestjar imtarrġa tal-B.4 (Il-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD) dwar l-irritazzjoni/il-korrużjoni dermali (4). Filwaqt li dan it-TM ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar il-korrużjoni tal-ġilda, għandu jiġi nnotat li l-B.40 bis (Linja Gwida 431 tat-Test tal-OECD) dwar il-korrużjoni tal-ġilda huwa bbażat fuq l-istess sistema ta' ttestjar tal-RhE, għad li juża protokoll ieħor (il-Kapitolu B.40 bis). Dan il-metodu huwa bbażat fuq il-mudelli tal-RhE billi jintużaw keratinoċiti umani, li għal-daqstant jirrappreżenta b'mod *in vitro* l-organu fil-mira tal-ispeċi ta' interess. Barra minn hekk, dan ikopri direttament il-pass inizjali tal-katina/mekkaniżmu infjammatorja/u tal-azzjoni (ħsara liċ-ċelloli u lit-tessut li tirriżulta fi trawma lokalizzata) li sseħħ/jseħħ waqt l-irritazzjoni *in vivo*. Ġiet ittestjata firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi fil-validazzjoni li hija l-bażi ta' dan it-TM u l-bażi ta' dejta empirika tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 58 sustanza kimika (16)(18)(23). Huwa applikabbli għal solidi, likwidi, semisolidi u xama'. Il-likwidi jistgħu jkunu milwiema jew mhux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jinħallu jew ma jinħallux fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jintaħnu fi trab fin qabel l-applikazzoni; mhuwa meħtieġ l-ebda trattament minn qabel tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx eżaminati fi studju ta' validazzjoni (24). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, it-TM attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u aerosols. Għandu jiġi nnotat ukoll li sustanzi kimiċi ferm ikkuluriti jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-vijabbiltà taċ-ċellola u jeħtieġu l-użu ta' kontrolli adattati għal korrezzjonijiet (ara l-paragrafi 24-26).

9. Sessjoni waħda ta' ttestjar magħmula minn tliet tessuti replikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu ħafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl replikat mhux konkordanti u/jew vijabbiltà tal-perċentwal medju daqs 50 ± 5 %, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet waħda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

▼M3

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Is-sustanza kimika tat-test hija applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, ifformata minn keratinoċiti mhux trasformati mnissla mill-epidermide umana, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermide* umana. Din tikkonsisti f'saff tal-qiegħ, saff spinuż u saff granulari organizzati, u *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellolari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analogu għal dawk li jinstabu *in vivo*.

11. Irritazzjoni tal-ġilda pprovokata minn sustanzi kimiċi, murija permezz ta' eritema u edema, hija r-riżultat ta' katina ta' avvenimenti li bdew mill-penetrazzjoni tal-i*stratum corneum* u l-ħsara lis-saffi ta' taħt il-keratinoċiti. Il-keratinoċiti li jkunu qed imutu jirrilaxxaw medjaturi li jibdew il-katina infjammatorja li jaġixxu fuq iċ-ċelloli fid-*dermis*, b'mod partikolari ċ-ċelloli stromali u endoteljali. Hija d-dilatazzjoni u l-permeabilità akbar taċ-ċelloli endoteljali li jipproduċu l-eritema u l-edema osservati (24). Il-metodi bbażati fuq l-RhE jkejlu l-avvenimenti tal-bidu tal-katina.

12. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli fil-mudelli tal-RhE titkejjel minn konverżjoni enzimatika tal-kulur vitali MTT [3-(4,5-Dimetiltijażol-2-il)-2,5-bromur tad-difeniltetrażolju, Thiażoljl blu; numru tal-CAS 298-93-1 f'melħ formażan blu li huwa mkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (25). Sustanzi kimiċi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà taċ-ċellola taħt il-livelli massimi definiti (jiġifieri ≤ 50 %, għall-GHS tan-NU/Kategorija 2 tas-CLP tal-UE). Skont il-qafas regolatorju li fih jintużaw ir-riżultati ta' dan it-TM, is-sustanzi kimiċi li jipproduċu vijabbiltajiet taċ-ċellola ogħla mil-livell massimu definit, jistgħu jitqiesu bħala mhux irritanti (jiġifieri > 50 %, L-Ebda Kategorija).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

13. Qabel l-użu ta' rutina ta' kwalunkwe mit-tliet metodi validati li jaderixxu ma' dan it-TM, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika, billi jużaw l-għaxar Sustanzi Kimiċi ta' Referenza elenkati fit-Tabella 1. Għal metodi simili żviluppati skont dan it-TM jew għal modifiki ta' kwalunkwe mit-tliet metodi validati, għandhom jiġu ssodisfati r-rekwiżiti tal-PS spjegati fl-Appendiċi 2 ta' dan it-TM qabel ma jintuża l-metodu għall-ittestjar regolatorju.

14. Bħala parti mill-eżerċizzju tal-profiċjenza, huwa rrakkomandat li l-utent jivverifika l-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-mudell tal-RhE. Dan huwa ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu jkun ġie stabbilit b'suċċess u tkun intweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu b'rutina, huwa rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

Tabella 1

Sustanzi Kimiċi ta' Referenza ([1])

Sustanza Kimika	Nru tal-CAS	Riżultat *in vivo* ([2])	Stat fiżiku	GHS tan-NU/ Kategorija tas-CLP tal-UE
aċidu naftilaċetiku	86-87-3	0	Solidu	L-ebda Kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Likwidu	L-ebda Kat.

▼M3

Sustanza Kimika	Nru tal-CAS	Riżultat *in vivo* (2)	Stat fiżiku	GHS tan-NU/ Kategorija tas-CLP tal-UE
stearate tal-metil	112-61-8	1	Solidu	L-ebda Kat.
butirat tal-ettil	5870-93-9	1,7	Likwidu	L-ebda Kat. (*Kat. 3 fakult-attiva*) (3), (4)
saliċilat tal-eżil	6259-76-3	2	Likwidu	L-ebda Kat. (*Kat. 3 fakult-attiva*) (3), (4)
ċiklamen tal-aldeid	103-95-7	2,3	Likwidu	Kat. 2
1-bromoeżan	111-25-1	2,7	Likwidu	Kat. 2
idrossidu tal-potassju (5 % soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	3	Likwidu	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperażina	5271-27-2	3,3	Solidu	Kat. 2
Ettanal	111-71-7	3,4	Likwidu	Kat. 2

(1) Dawn is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza huma sottosett tas-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza użati fl-istudju ta' validazzjoni.
(2) Ir-riżultat *in vivo* skont il-B.4 u l-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD (4).
(3) Taħt dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-Kategorija 3 (irritanti minuri) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1) hija meqjusa bħala L-Ebda Kategorija.
(4) Il-Kategorija 3 fakultattiva tal-GHS tan-NU mhijiex applikabbli skont is-CLP tal-UE.

PROĊEDURA

15. Din li ġejja hija deskrizzjoni tal-komponenti u l-proċeduri ta' metodu tal-RhE għal eżami ta' irritazzjoni tal-ġilda. Mudell tal-RhE għandu jiġi rikostruwit, u jista' jitħejja mill-persunal impjegat jew inkella miksub b'mod kummerċjali. Hemm disponibbli proċeduri Standard ta' Operat (SOPs— Standard Operating Procedures) għal EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) u SkinEthic™ RHE (26)(27)(28). L-ittestjar għandu jitwettaq skont dawn li ġejjin:

Komponenti tal-Metodu ta' ttestjar tal-RhE

Kundizzjonijiet ġenerali

16. Keratinoċiti umani mhux trasformati għandhom jintużaw sabiex jerġgħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegħ, *stratum spinosum, stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taħt *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali sabiex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta sabiex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi markaturi ċitotossiċi, pereżempju dodeċilsulfat tas-sodju (SDS — Sodium Dodecyl Sulphate) jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika markatriċi tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC_{50}) wara ħin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment meħtieġ sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50 % (ET_{50}) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika markatriċi b'konċentrazzjoni speċifika u fissa. Il-karatteristiċi ta' tażżin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-i*stratum corneum* għat-tessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun ħieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

▼M3

Kundizzjonijiet funzjonali

Vijabbiltà

17. L-analiżi użata għad-determinazzjoni tad-daqs tal-vijabbiltà hija l-analiżi tal-MTT (25). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom jiżguraw li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv (NC — Negative Control). Id-densità ottika (OD — Optical Density) tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri OD < 0,1. Firxa ta' aċċettabilità (l-ogħla limitu jew il-limitu inferjuri) għall-valuri tal-OD ta' kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar ta' Irritazzjoni tal-Ġilda) hija stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE, u l-firxiet ta' aċċettabilità għat-tliet metodi validati huma pprovduti fit-Tabella 2. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bl-NC huma stabbli fil-kultura (jipprovdu kejl tal-vijabbiltà simili) sakemm idum il-perjodu tat-test ta' esponiment.

Tabella 2

Firxiet ta' aċċettabilità għall-valuri negattivi tal-OD ta' kontroll

	Limitu inferjuri ta' aċċettabilità	L-ogħla limitu ta' aċċettabilità
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Funzjoni ta' protezzjoni

18. L-i*stratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed sabiex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi kimiċi markaturi ċitotossiċi, eżempju SDS jew Triton X-100, kif stmat minn IC_{50} jew ET_{50} (Tabella 3).

Morfoloġija

19. Għandu jitwettaq eżami istoloġiku tal-mudell tal-RhE li juri struttura li tixbah lill-*epidermide* umana (inkluż l-i*stratum corneum* b'saffi multipli).

Riproduċibbiltà

20. Ir-riżultati tas-sustanza kimika ta' kontroll pożittiv (PC – Positive Control) u l-kontrolli negattivi (NC) tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru riproduċibbiltà maż-żmien.

Kontroll tal-kwalità (QC – Quality Control)

21. L-iżviluppatur/il-fornitur tal-mudell tal-RhE għandu jiżgura u juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-*vijabbiltà* (paragrafu 17), il-*funzjoni ta' protezzjoni* (paragrafu 18) u l-*morfoloġija* (paragrafu 19) huma l-aktar rilevanti. Din id-dejta għandha tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu, sabiex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Firxa ta' aċċettabilità (l-ogħla limitu jew il-limitu inferjuri) għall-IC_{50} jew għall-ET_{50} għandhom jiġu stabbiliti mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE (jew l-investigatur meta jintuża l-mudell imfassal mill-persunal imħaddem). Dawk ir-riżultati li huma prodotti b'tessuti kkwalifikati biss jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli ta' klassifikazzjoni ta' irritazzjoni. Bħal pereżempju, il-firxiet ta' aċċettabilità għat-tliet metodi validati huma pprovduti fit-Tabella 3.

▼M3

Tabella 3

Eżempji ta' kriterji tal-QC ta' rilaxx tal-lott

	Limitu inferjuri ta' aċċettabilità	L-ogħla limitu ta' aċċettabilità
EpiSkin™ (SM) (trattament ta' 18-il siegħa b' SDS) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET_{50} = 4,8 hr	ET_{50} = 8,7 hr
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET_{50} = 4,0 hr	ET_{50} = 9,0 hr

Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u ta' Kontroll

22. Tal-inqas għandhom jintużaw tliet repliki għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli f'kull sessjoni. Għal-likwidi kif ukoll għas-solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test sabiex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-*epidermide* filwaqt li tiġi evitata doża infinita, jiġifieri għandu jintuża minimu ta' 25 µL/ċm^2 jew 25 mg/ċm^2. Għal solidi, il-wiċċ tal-*epidermide* għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni, sabiex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u l-wiċċ tal-*epidermide*. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinħasel bir-reqqa mill-wiċċ tal-*epidermide* b'bafer milwiem, jew b'0,9 % NaCl. Skont liema wieħed mit-tliet metodi tal-RhE validati jintuża, il-perjodu ta' esponiment ivarja bejn 15-il minuta u 60 minuta, u t-temperatura ta' inkubazzjoni bejn 20 u 37 °C. Dawn il-perjodi u t-temperaturi ta' esponiment huma ottimizzati għal kull metodu tal-RhE u jirrappreżentaw karatteristiċi intrinsiċi differenti tal-metodi, iżda għad-dettalji ara l-Proċeduri Standard ta' Operazzjoni (SOPs) għall-metodi (26)(27)(28).

23. F'kull sessjoni għandhom jintużaw NC u PC simultanji sabiex juru li l-vijabbiltà (mal-NC), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessut li tirriżulta (mal-PC) tat-tessuti huma fi ħdan firxa ta' aċċettabilità storika definita. Il-PC issuġġerit huwa ta' SDS 5 % milwiemi. Is-sustanzi kimiċi tal-NC huma ilma jew ilma bil-melħ ibbaferjat bil-fosfat (PBS — Phosphate Buffered Saline).

Kejl tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

24. L-aktar element importanti tal-proċedura tat-test huwa li l-kejl tal-vijabbiltà ma jsirx immedjatament wara l-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test, iżda wara perjodu, ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament tat-tessuti mlaħalħa f'mezz ġdid, twil biżżejjed. Dan il-perjodu jippermetti kemm l-irkupru minn effetti ċitotossiċi dgħajfa kif ukoll il-manifestazzjoni tal-effetti ċitotossiċi b'mod ċar. Il-fażi ta' ottimizzazzjoni tat-test (11) (12) (13) (14) (15) uriet li perjodu ta' inkubazzjoni ta' 42 siegħa wara t-trattament kien wieħed ottimali.

25. L-analiżi MTT hija metodu kwantitattiv validat li għandu jintuża sabiex ikejjel il-vijabbiltà taċ-ċellola taħt dan it-TM. Hija kompatibbli mal-użu f'bini ta' tessut tridimensjonali. Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni MTT b'konċentrazzjoni xierqa (eżempju 0,3 — 1 mg/mL) għal 3 sigħat. Imbagħad, il-prodott fromażan blu preċipitat jiġi estratt mit-tessut billi jintuża solvent (eżempju isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formażan titkejjel billi tiġi determinata l-OD ta' 570 nm billi jintuża filtru ta' faxx ta' frekwenza ta' massimu ta' ± 30 nm.

▼M3

26. Il-karatteristiċi ottiċi tas-sustanza kimika ta' ttestjar jew l-azzjoni kimika tagħha fuq l-MTT jistgħu jinterferixxu mal-analiżi u dan iwassal għal stima falza tal-vijabbiltà (għax is-sustanza kimika tat-test tista' tipprevjeni jew treġġa' lura l-ġenerazzjoni tal-kulur kif ukoll tikkawżaha). Dan jista' jseħħ meta sustanza kimika tat-test speċifika ma titneħħiex kompletament mit-tessut bi tlaħlīħ jew meta din tippenetra l-*epidermide*. Jekk sustanza kimika tat-test taġixxi direttament fuq l-MTT (tnaqqas l-MTT), ikollha kulur naturali, jew issir ikkulurita matul it-trattament tat-tessut, għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali sabiex jiġu identifikati u kkoreġuti l-interferenzi tas-sustanzi kimiċi tat-test mat-teknika ta' kejl tal-vijabbiltà. Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti li jagħtu l-kulur hija disponibbli fl-SOPs għat-tliet metodi validati (26)(27)(28).

Kriterji ta' aċċettabilità

27. Għal kull metodu li juża lottijiet tal-mudell tal-RhE validi (ara l-paragrafu 21), it-tessuti ttrattati bl-NC għandhom jimmanifestaw OD li tirrefletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-passi ta' kunsinna u riċevuta u l-proċessi kollha tal-protokoll. Valuri ta' kontroll tal-OD ma għandhomx ikunu aktar baxxi mil-limiti storikament stabbiliti. B'mod simili, it-tessuti ttrattati bil-PC, jiġifieri SDS 5 % milwiema, għandhom jirreflettu l-abbiltà tagħhom li jirreaġixxu għal sustanza kimika irritanti taħt il-kundizzjonijiet tat-TM (26) (27) (28). Għandhom jiġu ddefiniti l-miżuri assoċjati u adattati ta' varjabbiltà bejn ir-repliki tat-tessuti (eżempju jekk jintużaw devjazzjonijiet standard (SD — Standard Deviations) dawn għandhom ikunu fi ħdan l-intervall ta' tolleranza unilaterali ta' 95 % ikkalkolat mid-dejta storika; għall-SD tal-VRM < 18 %).

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir

28. Il-valuri tal-OD miksuba minn kull sustanza kimika tat-test jistgħu jintużaw sabiex jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' vijabbiltà normalizzat għall-NC, li huwa stabbilit għal 100 %. Il-valur ta' limitu ta' perċentwal tal-vijabbiltà ta' ċellola li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test irritanti minn dawk mhux klassifikati u l-proċedura/i statistika/statistiċi użata/i sabiex jiġu evalwati r-riżultati u jiġu identifikati s-sustanzi kimiċi irritanti għandhom jiġu ddefiniti u dokumentati b'mod ċar u għandu jintwera li dawn huma xierqa. Il-valuri ta' limitu għat-tbassir tal-irritazzjoni huma pprovduti hawn taħt:

— Is-sustanza kimika tat-test hija kkunsidrata bħala irritanti għall-ġilda skont il-GHS tan-NU/il-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE jekk il-vijabbiltà tat-tessut wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun inqas minn jew daqs (≤) 50 %,

— Skont il-qafas regolatorju li fih jintużaw ir-riżultati ta' dan it-TM, is-sustanza kimika tat-test tista' titqies bħala mhux irritanti għall-ġilda skont L-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/is-CLP tal-UE jekk il-vijabbiltà tat-tessut wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun aktar minn (>) 50 %.

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

29. Għal kull sessjoni, dejta minn tessuti replikati individwali (pereżempju valuri tal-OD u dejta dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċellola għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-dejta minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-SD ± medji għal kull sessjoni. Interazzjonijiet osservati mar-reaġent u s-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti tal-MTT għandhom jiġu rrapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

▼**M3**

Rapport tat-test

30. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi Kimiċi tat-Test u ta' Kontroll:

— L-isem/l-ismijiet tas-sustanzi kimiċi bħall-isem u n-numru tal-CAS, l-isem u n-numru tal-KE, jekk dawn ikunu magħrufa,

— Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza kimika (f'perċentwal(i) skont il-piż),

— Karatteristiċi fiżiċi/kimiċi rilevanti għat-twettiq tal-istudju (pereżempju l-istat fiżiku, l-istabbiltà, il-volatilità, il-pH u s-solubilità fl-ilma jekk dawn ikunu magħrufa),

— Trattament tas-sustanzi kimiċi tat-test/ta' kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tisħin, tħin),

— Kundizzjonijiet ta' ħżin.

Ġustifikazzjoni tal-mudell tal-RhE u tal-protokoll użati

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Sistema ta' ċelloli użati;

— Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din l-informazzjoni għandha tiġi inkluża, iżda ma għandhiex tkun limitata għal dawn:

  i) vijabbiltà;

  ii) funzjoni ta' protezzjoni;

  iii) morfoloġija;

  iv) riproduċibbiltà u prevedibbiltà;

  v) Kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell,

— Dettalji tal-proċedura tat-test użata,

— Doża tat-test użati, dewmien tal-esponiment u l-perjodu ta' inkubazzjoni wara t-trattament,

— Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test,

— Referenza għad-dejta storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:

  i) aċċettabilità tad-dejta tal-QC b'referenza għad-dejta storika tal-lottijiet;

  ii) aċċettabilità tal-valuri ta' kontroll pożittivi u negattivi b'referenza għall-mezzi u l-meded ta' kontroll pożittivi u negattivi,

— Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati, inkluża l-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-punt (i) ta' limitu għall-mudell ta' tbassir,

— Referenza għad-dejta storika ta' kontroll.

▼M3

Riżultati:

— Tqassim tad-dejta f'forma tabulari minn sustanzi kimiċi tat-test individwali għal kull sessjoni u għal kull kejl ta' replika,

— Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal sustanzi kimiċi diretti li jnaqqsu l-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerħu l-kulur,

— Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati.

Diskussjoni dwar ir-riżultati

Konklużjoni

LETTERATURA

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Tielet edizzjoni riveduta, UN New York and Geneva. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) EC-ECVAM (2009), Statement on the "Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards", maħruġ mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC30), 9 ta' April 2009. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 404, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 430, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 431, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 435, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) KE-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment Nru 34, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. u Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57–93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. u Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. u Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. u Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests — An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. u Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329–349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. u Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109–129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. u Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559–601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. u Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. u Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy — Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351–358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 ta' Novembru 2008. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, Nru 137, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. u Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231–243.

▼M3

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55–63.

(26) EpiSkin™ SOP, Verżjoni 1.8 (Frar 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min — 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Verżjoni 7.0 (Riveduta Marzu 2009), Protokoll għal: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Verżjoni 2.0 (Frar 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., u Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Id-Direttiva tal-kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awwissu 2001 li taddatta għall-progres tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikoluż, ĠU L 225, 21.8.2001, p. 1.

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. u Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1–4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. u Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359–365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. u Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109–116.

▼M3

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Preċiżjoni: Il-viċinanza tal-qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija miżura ta' prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u aspett wieħed ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (14).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni li huwa indikattiv ta' rispons pożittiv.

Konċentrazzjoni stmata ta' tlieta (EC3): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' tlieta.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala negattiv jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl sa fejn il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hija determinata matul il-proċessi ta' validazzjoni u ta' validazzjoni minn qabel, u tindika sa fejn test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (14).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (14).

Test "me-too": Espressjoni li tingħad fit-taħdit komuni għal metodu ta' ttestjar li huwa strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' referenza validat u aċċettat. Metodu ta' ttestjar bħal dan ikun kandidat għal validazzjoni rapida ("catch-up validation"). Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili (14).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħra f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Standards ta' Prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li huwa simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inklużi; (i) komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati sabiex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' preċiżjoni u affidabbiltà, ibbażati fuq x'inkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta jiġi evalwat billi tintuża l-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (14).

▼**M3**

Metodu ta' ttestjar ta' speċjalità: Metodu ta' ttestjar li l-manifattura u d-distribuzzjoni tiegħu huma ristretti minn privattivi, drittijiet tal-awtur, marki kummerċjali, eċċ.

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li skontu l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta jiġu vvalutati minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Sustanzi kimiċi ta' referenza: Sustanzi kimiċi magħżula għall-użu fil-proċess ta' validazzjoni, li għalihom huma diġà magħrufa r-reazzjonijet fis-sistema ta' ttestjar ta' referenza *in vitro* jew *in vivo* jew l-ispeċi ta' interess. Dawn is-sustanzi kimiċi għandhom ikunu rappreżentanti tal-klassijiet ta' sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni jintuża l-metodu ta' ttestjar, u dawn għandhom jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' reazzjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mis-sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni li jintuża dan il-metodu ta' ttestjar, minn qawwija, għal dgħajfa, sa negattivi. Settijiet differenti ta' sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa għall-istadji differenti tal-proċess ta' validazzjoni, u għal metodi ta' ttestjar u użi tat-testijiet differenti (14).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-ħila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-konsiderazzjoni tal-preċiżjon (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (14).

Affidabbiltà: Kejl li jiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fi ħdan u bejn il-laboratorji maż-żmien, meta dan jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hija eżaminata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà intralaboratorja u dik interlaboratorja (14).

Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku induttur, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jeżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dik fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li hija msemmija wkoll sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih tlestew studji ta' validazzjoni sabiex jiġu ddeterminati r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabbiltà għal skop speċifiku. Huwa importanti li jiġi osservat li metodu ta' ttestjar validat jista' ma jkollux prestazzjoni suffiċjenti f'termini ta' preċiżjoni u affidabbiltà sabiex jitqies aċċettabbli għall-iskop propost (14).

▼M3

Appendiċi 2

Standards ta' prestazzjoni għall-valutazzjoni ta' metodi ta' *epidermis* umana rikostruwita (RhE) *in vitro* simili jew immodifikati proposti għall-irritazzjoni tal-ġilda

INTRODUZZJONI

1. L-għan tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) huwa li tiġi kkomunikata l-bażi li permezz tagħha metodi ġodda, kemm proprjetarji (jiġifieri, bi drittijiet tal-awtur, b'marka kummerċjali, irreġistrati) kif ukoll mhux proprjetarji jistgħu jitqiesu li għandhom preċiżjoni u affidabbiltà suffiċjenti għal skopijiet speċifiċi ta' ttestjar. Dawn il-PS, ibbażati fuq metodi vvalidati u aċċettati, jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tal-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodi analogi oħrajn (magħrufin bħala testijiet "me-too") li huma bbażati fuq prinċipji xjentifiċi simili u jkejlu jew ibassru l-istess effett bijoloġiku jew tossiku (9).

2. Qabel l-adozzjoni ta' metodi mmodifikati, jiġifieri titjib potenzjali propost ta' metodu approvat, għandu jkun hemm evalwazzjoni sabiex ikun stabbilit l-effett tal-bidliet proposti fuq ir-rendiment tat-test u sa liema punt dawn il-bidliet jaffettwaw l-informazzjoni disponibbli għall-komponenti l-oħrajn tal-proċess ta' validazzjoni. Skont l-għadd u t-tip ta' bidliet proposti, id-dejta ġġenerata u d-dokumentazzjoni ta' appoġġ għal dawk il-bidliet, dawn jew għandhom ikunu soġġetti għall-istess proċess ta' validazzjoni kif deskritt għal test ġdid, kif ukoll, jekk xieraq, għal evalwazzjoni limitata tal-affidabbiltà u r-rilevanza permezz ta' PS stabbiliti (9).

3. Metodi simili (me-too) jew immodifikati ta' kwalunkwe wieħed mit-tliet metodi vvalidati [EpiSkin™ (Metodu ta' Referenza Vvalidat (Validated Reference Method — VRM)), EpiDerm™ SIT (EPI-200) u SkinEthic™ RHE] proposti għall-użu taħt dan it-TM għandhom jiġu evalwati sabiex jiġu stabbiliti l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tagħhom permezz ta' sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw il-firxa sħiħa tal-punteġġi ta' irritazzjoni Draize. Meta jiġu evalwati permezz tal-20 Sustanza kimika ta' Referenza rrakkomandati tal-PS (Tabella 1), il-metodi simili jew immodifikati proposti għandu jkollhom valuri ta' affidabbiltà u preċiżjoni li jkunu komparabbli jew aqwa minn dawk li ħarġu mill-VRM (Tabella 2) (2) (16). Il-valuri ta' affidabbiltà u preċiżjoni li għandhom jinkisbu huma pprovduti fil-paragrafi 8 sa 12 ta' dan l-Appendiċi. Sustanzi kimiċi mhux ikklassifikati (Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) u kklassifikati (Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP) (1), li jirrappreżentaw klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi huma inklużi, sabiex l-affidabbiltà u l-preċiżjoni (is-sensittività, l-ispeċifiċità u l-preċiżjoni ġenerali) tal-metodu propost jistgħu jitqabblu ma' dawk tal-VRM. L-affidabbiltà tal-metodu, kif ukoll il-kapaċità tiegħu li jidentifika tajjeb sustanzi kimiċi irritanti fil-Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP u, skont il-qafas regolatorju li għalih tiġi prodotta d-dejta, il-kapaċità tiegħu wkoll li jidentifika tajjeb sustanzi kimiċi ta' Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP (għandha tiġi stabbilita qabel l-użu tiegħu għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi tat-test ġodda.

4. Dawn il-PS huma bbażati fuq il-PS tal-EC-ECVAM (8), aġġornati skont is-sistemi dwar il-klassifikazzjoni u t-tikkettar tal-UN GHS u tal-EU CLP (1) (3). Il-PS oriġinali kienu definiti wara li tlesta l-istudju ta' validazzjoni (21) u kienu bbażati fuq is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-UE kif stipulata fid-Direttiva tal-Kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awwissu 2001 li tadatta għall-progress tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill Nru 67/548/KEE dwar l-approssimazzjoni tal-liġijiet, ir-regolamenti u d-dispożizzjonijiet

▼M3

amministrattivi rigward il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar tas-sustanzi perikoluži [1]. Minħabba l-adozzjoni tas-sistema UN GHS għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar fl-UE (EU CLP) (3), li seħħet bejn il-finalizzazzjoni tal-istudju ta' validazzjoni u t-tlestija ta' dan it-TM, il-PS ġew aġġornati (8). Dan l-aġġornament jirrigwarda l-aktar il-bidliet (i), fis-sett ta' PS għas-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza; u (ii), il-valuri definiti ta' affidabbiltà u preċiżjoni (2) (23).

STANDARDS TA' PRESTAZZJONI GĦAL METODI TA' TTESTJAR *IN VITRO* TAL-RhE GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA

5. Il-PS jinkludi dawn it-tliet elementi (9):

I) Komponenti Essenzjali tal-Metodu ta' Ttestjar

II) Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza

III) Valuri Definiti ta' Affidabbiltà u Preċiżjoni

I) **Komponenti Essenzjali tal-Metodu ta' Ttestjar**

6. Dawn jikkonsistu f'elementi essenzjali strutturali, funzjonali u proċedurali ta' metodu vvalidat li għandhom ikunu inklużi fil-protokoll ta' metodu mekkanikament u funzjonalment simili jew immodifikat propost. Dawn il-komponenti jinkludu karatteristiċi uniċi tal-metodu, dettalji proċedurali kritiċi, u miżuri ta' kontroll tal-kwalità. Il-konformità mal-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar tgħin sabiex tiżgura li metodu propost ieħor simili jew immodifikat ikun ibbażat fuq l-istess kunċetti bħall-VRM korrispondenti (9). Il-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar huma deskritti fid-dettall fil-paragrafi 16 sa 21 tat-TM u l-ittestjar għandu jsir skont dan li ġej:

— Il-kundizzjonijiet ġenerali (paragrafu 16),

— Il-kundizzjonijiet funzjonali, li jinkludu:

— vijabbiltà (paragrafu 17),

— funzjoni ta' barriera (paragrafu 18),

— morfoloġija (paragrafu 19),

— riproduċibbiltà (paragrafu 20), u,

— kontroll tal-kwalità (paragrafu 21).

II) **Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza**

7. Is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza jintużaw sabiex jiġi stabbilit jekk l-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodu simili jew immodifikat propost, ippruvat li huwa strutturalment u funzjonalment simili biżżejjed għall-VRM, jew li jirrappreżenta modifika żgħira ta' wieħed mit-tliet metodi vvalidati, humiex komparabbli jew aqwa minn dawk tal-VRM (2) (8) (16) (23). L-20 Sustanza Kimika ta' Referenza rrakkomandati elenkati fit-Tabella 1 jinkludu sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi (jiġifieri kategoriji ta' sustanzi kimiċi bbażati fuq gruppi funzjonali), u jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' punteġġi ta' irritazzjoni Draize (minn xejn irritanti għal ferm irritanti) Is-sustanzi kimiċi inklużi fil-lista jinkludu għaxar (10) sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP u għaxar (10) sustanzi kimiċi mhux kategorizzati, li minnhom tlieta huma sustanzi kimiċi fakultattivi tal-Kategorija 3 tal-UN GHS. Taħt dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-Kategorija 3 fakultattiva hija meqjusa bħala Ebda Kategorija. Is-sustanzi kimiċi elenkati fit-Tabella 1 huma magħżula mis-sustanzi kimiċi użati fil-fażi ta' ottimizzazzjoni li segwiet il-prevalidazzjoni u fl-istudju tal-validazzjoni tal-VRM, fir-rigward tal-funzjonalità kimika u l-istat fiżiku (14) (18). Dawn is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza

[1] ĠU L 225, 21.8.2001, p. 1.

▼M3

jirrappreżentaw l-inqas għadd ta' sustanzi kimiċi li għandhom jintużaw għall-evalwazzjoni tal-preċiżjoni u l-affidabbiltà ta' metodu simili jew immodifikat propost, iżda ma għandhomx jintużaw għall-iżvilupp ta' metodi ġodda. F'sitwazzjonijiet fejn sustanza kimika elenkata ma tkunx disponibbli, jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi oħrajn li għalihom hemm disponibbli dejta ta' referenza *in vivo* adegwata, prinċipalment mis-sustanzi kimiċi użati fil-fażi ta' ottimizzazzjoni li segwiet il-prevalidazzjoni u fl-istudju tal-validazzjoni tal-VRM. Jekk ikun mixtieq, sustanzi kimiċi oħrajn li jirrappreżentaw klassijiet ta' sustanzi kimiċi oħrajn u li għalihom hemm disponibbli dejta ta' referenza *in vivo* adegwata jistgħu jiżdiedu mal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza sabiex il-preċiżjoni tal-metodu propost tiġi evalwata aktar.

Tabella 1:

Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza għad-Determinazzjoni tal-Valuri tal-Preċiżjoni u l-Affidabbiltà għal Metodi Simili jew Immodifikati ta' RhE għall-irritazzjoni tal-Ġilda ([1])

Sustanza Kimika	Numru tal-CAS	Stat Fiżiku	Punteġġ*in vivo*	Kat. *in vitro* VRM	Kat. *in vivo* tal-UN GHS/EU CLP
1-bromo-4-klorobutan	6940-78-9	Likwidu	0	Kat. 2	Ebda Kat.
ftalat tad-dietil	84-66-2	Likwidu	0	Ebda Kat.	Ebda Kat.
aċidu naftil aċetiku	86-87-3	Solidu	0	Ebda Kat.	Ebda Kat.
fenossi aċetat tal-allil	7493-74-5	Likwidu	0,3	Ebda Kat.	Ebda Kat.
isopropanol	67-63-0	Likwidu	0,3	Ebda Kat.	Ebda Kat.
4-metil-tijo-benżaldeid	3446-89-7	Likwidu	1	Kat. 2	Ebda Kat.
stearat tal-metil	112-61-8	Solidu	1	Ebda Kat.	Ebda Kat.
butirat tal-ettil	5870-93-9	Likwidu	1,7	Ebda Kat.	Ebda Kat.
saliċilat tal-eżil	6259-76-3	Likwidu	2	Ebda Kat.	Ebda Kat.
Ċinnamaldeid	104-55-2	Likwidu	2	Kat. 2	Ebda Kat. (*Kat. 3 Fakultattiva*) ([3])
1-dekanol ([2])	*112-30-1*	*Likwidu*	*2,3*	*Kat. 2*	*Kat. 2*
aldeid taċ-ċiklamen	103-95-7	Likwidu	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromoeżan	111-25-1	Likwidu	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-klorometil-3,5-dimetil-4-metossipiridina HCl	86604-75-3	Solidu	2,7	Kat. 2	Kat. 2
disulfur tad-di-n-propil ([2])	*629-19-6*	*Likwidu*	*3*	*Ebda Kat.*	*Kat. 2*
idrossidu tal-potassju (5 % soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	Likwidu	3	Kat. 2	Kat. 2
benżentijol, 5-(1,1-dimetiletil)-2-metil	7340-90-1	Likwidu	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperażina	5271-27-2	Solidu	3,3	Kat. 2	Kat. 2

▼M3

Sustanza Kimika	Numru tal-CAS	Stat Fiżiku	Punteġġ*in vivo*	Kat. *in vitro* VRM	Kat. *in vivo* tal-UN GHS/EU CLP
Ettanal	111-71-7	Likwidu	3,4	Kat. 2	Kat. 2
Tetrakloroetilen	127-18-4	Likwidu	4	Kat. 2	Kat. 2

([1]) L-għażla tas-sustanzi kimiċi hija bbażata fuq il-kriterji li ġejjin: (i) is-sustanzi kimiċi huma disponibbli kummerċjalment; (ii) jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' punteġġi ta' irritazzjoni Draize (minn xejn irritanti għal ferm irritanti); (iii) għandhom struttura kimika definita sew; (iv) jirrappreżentaw il-funzjonalità kimika użata fil-proċess ta' validazzjoni; u (v) mhumiex assoċjati ma' profil estremament tossiku (eż. karċinoġeniċi jew tossiċi għas-sistema riproduttiva) u mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.
([2]) Sustanzi kimiċi irritanti fil-fenek iżda li għalihom hemm evidenza affidabbli li mhumiex irritanti fil-bnedmin (31) (32) (33).
([3]) Taħt il-UN GHS, mhux fl-EU CLP.

III) **Valuri Definiti ta' Affidabbiltà u Preċiżjoni**

8. Għall-finijiet tal-istabbiliment tal-affidabbiltà u r-rilevanza ta' metodi proposti simili jew immodifikati li għandhom jiġu trasferiti bejn il-laboratorji, l-20 Sustanza Kimika ta' Referenza fit-Tabella 1 għandhom jiġu ttestjati mill-inqas fi tliet laboratorji. Madankollu, jekk il-metodu propost ser jintuża f'laboratorju wieħed biss ma jkunx meħtieġ ittestjar f'diversi laboratorji għall-validazzjoni. Madankollu huwa essenzjali li dawn l-istudji ta' validazzjoni jiġu evalwati b'mod indipendenti minn entitajiet ta' validazzjoni rikonoxxuti internazzjonalment, bi qbil ma' linji gwida internazzjonali (9). F'kull laboratorju, l-20 Sustanza Kimika ta' Referenza kollha għandhom ikunu ttestjati fi tliet sensiliet ta' testijiet indipendenti magħmula b'lottijiet ta' tessut differenti u f ħinijiet spazjati biżżejjed bejniethom. Kull sensiela ta' testijiet għandha tikkonsisti minn minimu ta' tliet repliki ta' tessut ittestjati fl-istess ħin għal kull sustanza kimika tat-test inkluża, NC u PC.

9. Il-kalkolu tal-valuri tal-affidabbiltà u tal-preċiżjoni tal-metodu propost għandu jsir bil-konsiderazzjoni tal-erba' kriterji hawn taħt flimkien, filwaqt li jiġi żgurat li l-valuri għall-affidabbiltà u r-rilevanza jiġu kkalkulati b'mod konsistenti u definit minn qabel:

   1. Id-dejta minn sensiliet ta' testijiet minn sekwenzi sħaħ ta' sensiliet ta' testijiet biss tikkwalifika għall-kalkolu tal-metodu u tal-varjabbiltà u l-kapaċità ta' previżjoni fil-laboratorju u bejn il-laboratorji (preċiżjoni).

   2. Il-klassifikazzjoni finali għandha tinkiseb billi jintuża l-valur medju tal-vijabbiltà fuq is-sensiliet differenti ta' sekwenza sħiħa ta' sensiela ta' testijiet.

   3. Id-dejta miksuba għal sustanzi kimiċi li għandhom sekwenzi sħaħ ta' sensiliet ta' testijiet fil-laboratorji parteċipanti kollha biss tikkwalifika għall-kalkolu tal-metodu ta' varjabbiltà bejn il-laboratorji.

   4. Il-kalkolu tal-valuri ta' preċiżjoni għandu jsir fuq il-bażi ta' previżjonijiet tal-laboratorju individwali miksuba għall-20 Sustanza ta' Kimika ta' Referenza mil-laboratorji parteċipanti differenti.

   F'dan il-kuntest, **sekwenza ta' sensiela ta' testijiet** tikkonsisti fi tliet sensiliet ta' testijiet indipendenti minn laboratorju wieħed għal sustanza kimika tat-test waħda. **Sekwenza sħiħa ta' sensiela ta' testijiet** hija sekwenza ta' sensiela ta' testijiet minn laboratorju wieħed għal sustanza kimika tat-test waħda fejn it-tliet sensiliet ta' testijiet ikunu validi. Dan ifisser li kull sensiela invalida tinvalida sekwenza sħiħa ta' sensiela ta' testijiet ta' tliet sensiliet.

Riproduċibbiltà fil-laboratorju

10. Il-valutazzjoni tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju għandha turi konkordanza ta' klassifikazzjonijiet (Kategorija 2 jew Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) miksuba f'sensiliet ta' testijiet differenti u indipendenti tal-20 Sustanza Kimika ta' Referenza f'laboratorju wieħed ugwali għal jew aktar (≥) minn 90 %.

▼M3

Riproduċibbiltà bejn il-laboratorji

11. Il-valutazzjoni tar-riproduċibbiltà bejn il-laboratorji mhijiex meħtieġa jekk il-metodu propost se jintuża f'laboratorju wieħed biss. Għall-metodi li għandhom jiġu ttrasferiti bejn il-laboratorji, il-konkordanza bejn il-klassifikazzjonijiet (Kategorija 2 jew Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) miksuba f'sensiliet ta' testijiet differenti u indipendenti tal-20 Sustanza Kimika ta' Referenza preferibbilment minn mill-inqas tliet laboratorji għandha tkun ugwali għal jew aktar (≥) minn 80 %.

Kapaċità ta' previżjoni (preċiżjoni)

12. Il-preċiżjoni (sensittività, speċifiċità u preċiżjoni ġenerali) tal-metodu simili jew immodifikat propost għandha tkun komparabbli jew aqwa minn dik tal-VRM, filwaqt li tiġi kkunsidrata informazzjoni addizzjonali relatata mar-rilevanza fl-ispeċijiet ta' interess (Tabella 2). Is-sensittività għandha tkun ugwali għal jew ogħla (≥) minn 80 % (2) (8) (23). Madankollu, hemm restrizzjoni speċifika oħra li tapplika għas-sensittività tal-metodu *in vitro* propost inkwantu żewġ sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2 *in vivo*, *1-dekanol* u *disulfur tad-di-n-propil,* jistgħu jiġu kklassifikati ħażin bħala Ebda Kategorija minn aktar minn laboratorju wieħed parteċipant. L-ispeċifiċità għandha tkun ugwali għal jew ogħla (≥) minn 70 % (2) (8) (23). Mhemmx aktar restrizzjonijiet rigward l-ispeċifiċità tal-metodu *in vitro* propost, jiġifieri, kull laboratorju parteċipant jista' jikklassifika ħażin kwalunkwe sustanza kimika *in vivo* ta' Ebda Kategorija sakemm l-ispeċifiċità finali tal-metodu ta' ttestjar tkun f'firxa aċċettabbli. L-preċiżjoni ġenerali għandha tkun ugwali għal jew ogħla (≥) minn 75 % (2) (8) (23). Għalkemm is-sensittività tal-VRM ikkalkulata għall-20 Sustanza Kimika ta' Referenza elenkati fit-Tabella 1 hija ugwali għal 90 %, il-valur ta' sensittività minimu definit meħtieġ għal kwalunkwe metodu simili jew immodifikat sabiex ikun ikkunsidrat validu huwa stabbilit għal 80 % minħabba li kemm *1-dekanol* (sustanza kimika marġinali) u *disulfur tad-di-n-propil* (negattiv falz tal-VRM) huma magħrufa li mhumiex irritanti fil-bnedmin (31) (32) (33), għalkemm huma identifikati bħala irritanti fit-test fuq il-fenek. Minħabba li l-mudelli tal-RhE huma bbażati fuq ċelloli ta' oriġini mill-bniedem, jistgħu jbassru dawn is-sustanzi kimiċi bħala mhux irritanti (Ebda Katergorija tal-UN GHS/EU CLP).

Tabella 2.

Valuri ta' tbassir meħtieġa għas-sensittività, l-ispeċifiċità u l-preċiżjoni ġenerali għal kull metodu simili jew immodifikat sabiex jiġi kkunsidrat validu.

Sensittività	Speċifiċità	Preċiżjoni Ġenerali
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tal-Istudju

13. Huwa possibbli li test wieħed jew aktar fuq sustanza kimika waħda jew aktar ma jissodisfax/jissodisfawx il-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test għat-test u għas-sustanzi kimiċi ta' kontroll jew ma jkunx/jkunux aċċettabbli għal raġunijiet oħrajn. Biex dejta nieqsa tiġi kkumplimentata, għal kull sustanza kimika ta' test huwa ammissibbli għadd massimu ta' żewġ testijiet oħrajn ("ittestjar mill-ġdid"). B'mod aktar preċiż, minħabba li fil-każ tal-ittestjar mill-ġdid il-PC u l-NC ukoll għandhom ikunu ttestjati fl-istess ħin, jista' jsir għadd massimu ta' żewġ sensiliet ta' testijiet oħra għal kull sustanza kimika tat-test.

14. Huwa konċepibbli li anki wara l-ittestjar mill-ġdid, l-għadd minimu ta' tliet sensiliet ta' testijiet validi meħtieġa għal kull sustanza kimika ttestjata ma jinkisibx għal kull Sustanza Kimika ta' Referenza f'kull laboratorju parteċipant, li jwassal għal matriċi tad-dejta mhux kompluta. F'dawn il-każijiet it-tliet kriterji li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati kollha sabiex il-ġabriet tad-dejta jitqiesu aċċettabbli:

    1. Kull waħda mill-20 Sustanza Kimika ta' Referenza għandu jkollha mill-inqas sekwenza waħda sħiħa ta' sensiela ta' testijiet.

▼**M3**

2. F’kull wieħed minn mill-inqas tliet laboratorji parteċipanti, minimu ta’ 85 % tas-sekwenzi tas-sensiliet ta’ testijiet għandhom ikunu sħaħ (għal 20 sustanza kimika, jiġifieri 3 sekwenzi ta’ sensiela ta’ testijiet invalidi huma permessi f’laboratorju wieħed).

3. Minimu ta’ 90 % tas-sekwenzi kollha ta’ sensiliet ta’ testijiet minn mill-inqas tliet laboratorji għandhom ikunu sħaħ (għal 20 sustanza kimika ttestjati fi tliet laboratorji; jiġifieri sitt sekwenzi ta’ sensiela ta’ testijiet invalidi huma permessi b’kollox).

▼M2

B. 47 **IL-METODU TA' TTESTJAR TAL-OPAĊITÀ U TAL-PERMEABILITÀ TAL-KORNEA TAL-BOVINI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KORRUŻIVI U IRRITANTI SEVERI GĦALL-GĦAJNEJN**

DAĦLA

1. Il-metodu ta' ttestjar tal-Opaċità u tal-Permeabilità tal-Kornea tal-Bovini (BCOP) huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuża, f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi, sabiex sustanzi u taħlitiet jiġu kklassifikati bħala "sustanzi korruživi u irritanti severi għall-għajnejn" (1) (2) (3). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, irritanti severi huma ddefiniti bħala dawk li jikkawżaw leżjonijiet fl-għajnejn li jippersistu fil-fenek għal tal-anqas 21 jum wara l-amministrazzjoni. Filwaqt li ma jitqiesx validu bħala sostituzzjoni kompluta għat-test *in vivo* li jsir fuq għajnejn il-fniek, il-BCOP huwa rrakkomandat biex jintuża bħala strateġija ta' ttestjar imtarraġ għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar regolatorji fi ħdan dominju speċifiku ta' applikabilità (4) (5). Is-sustanzi tat-test u t-taħlitiet (6) jistgħu jiġu kklassifikati bħala sustanzi korruživi jew irritanti severi għall-għajnejn mingħajr ma jsir aktar ittestjar fuq il-fniek. Sustanza li tagħti riżultat negattiv tkun teħtieġ li tiġi ttestjata fuq il-fniek permezz ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali, kif deskritt fil-Linja Gwida għall-Ittestjar tal-OECD 405 (7) (il-kapitolu B.5 ta' dan l-Anness).

2. L-għan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża korružività jew irritazzjoni severa kif imkejla mill-ħila tas-sustanza li tikkawża opaċità jew żieda fil-permeabilità f'kornea bovina iżolata. L-effetti tossiċi għall-kornea jitkejlu skont: (i) it-trażmissjoni mnaqqsa tad-dawl (opaċità), u (ii) iż-żieda fil-passaġġ taż-żebgħa fluworexxina tas-sodju (permeabilità). Il-valutazzjonijiet tal-opaċità u l-permeabilità tal-kornea wara esponiment għas-sustanza tat-test jiġu kkombinati għad-derivazzjoni ta' Punteġġ tal-Irritanza *In Vitro* (IVIS), li jintuża biex jiġi kklassifikat il-livell ta' kemm tikkawża irritazzjoni s-sustanza tat-test.

3. L-irritanti għall-għajnejn li jikkawżaw leżjonijiet li jitilqu f'anqas minn 21 jum u sustanzi li mhumiex irritanti ġew ittestjati wkoll bl-użu tal-metodu ta' ttestjar BCOP. Madankollu, l-akkuratezza u l-kredibilità tal-metodu ta' ttestjar BCOP għas-sustanzi f'dawn il-kategoriji ma ġewx evalwati b'mod formali.

4. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

5. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll tal-metodu ta' ttestjar BCOP tal-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interaġenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM) (8), li ġie żviluppat wara studju ta' validazzjoni internazzjonali (4)(5)(9), b'kontribuzzjonijiet miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Ċentru Ġappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM). Il-protokoll huwa bbażat fuq tagħrif miksub mill-Istitut għax-Xjenzi In Vitro (IIVS) u l-Protokoll 124 INVITTOX (10), li jirrappreżentaw il-protokoll użat għall-istudju tal-prevalidazzjoni tal-assaġġ BCOP, li twettaq bejn l-1997 u l-1998 u li kien sponsorjat mill-Komunità Ewropea. Iż-żewġ protokolli huma bbażati fuq il-metodoloġija ta' assaġġ BCOP li ġiet irrappurtata għall-ewwel darba minn Gautheron *et al* (11).

▼M2

6. Il-limitazzjonijiet identifikati għal dan il-metodu ta' ttestjar huma bbażati fuq ir-rati għoljin ta' pożittivi foloz għall-alkoħols u l-ketoni u r-rata għolja ta' negattivi foloz għas-solidi osservata fil-bażi tad-dejta tal-validazzjoni (ara l-paragrafu 44) (5). Meta s-sustanzi ta' dawn il-klassijiet kimiċi u fiżiċi jiġu eskluży mill-bażi tad-dejta, l-akkuratezza tal-BCOP skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS titjieb b'mod sostanzjali (5). Abbażi tal-għan ta' dan l-assaġġ (*i.e.*, li jidentifika biss is-sustanzi korrużivi/irritanti severi għall-għajnejn), rati ta' negattivi foloz mhumiex kritiċi minħabba li tali sustanzi sussegwentement jiġu ttestjati fuq il-fniek jew b'testijiet oħra *in vitro* vvalidati b'mod xieraq, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali b'approċċ ibbażat fuq l-importanza tal-evidenza. Barra minn hekk, il-bażi tad-dejta tal-validazzjoni attwali ma tippermettix evalwazzjoni xierqa ta' wħud mill-klassijiet kimiċi jew tal-prodotti (*eż.*, it-taħlitiet). Madankollu, l-investigaturi jistgħu jqisu li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għat-tipi kollha ta' materjali tat-test (inklużi t-taħlitiet), fejn riżultat pożittiv ikun jista' jiġi aċċettat bħala indikattiv ta' reazzjoni għal sustanza korrużiva jew irritant sever għall-għajnejn. Madankollu, riżultati pożittivi miksuba bl-alkoħols jew il-ketoni għandhom jiġu interpretati b'ċertu kawtela minħabba r-riskju ta' tbassir żejjed.

7. Il-proċeduri kollha li jinvolvu għajnejn bovini u kornej bovini għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri applikabbli tal-istallazzjoni tal-ittestjar f'dak li għandu x'jaqsam mal-manipulazzjoni ta' materjali dderivati mill-annimali, li jinkludu, iżda li mhumiex limitati għal, tessuti u fluwidi tat-tessuti. Il-prekawzjonijiet universali tal-laboratorji huma rrakkomandati (12).

8. Limitazzjoni tal-metodu ta' ttestjar hija dik li, għalkemm il-metodu jqis uħud mill-effetti fuq l-għajnejn evalwati fil-metodu ta' ttestjar tal-irritanza f'għajnejn il-fenek u sa ċertu punt is-severità tagħhom, il-metodu ma jqisx feriti fil-konġuntiva u fil-ħabba tal-għajnejn. Barra dan, għalkemm ir-riversibilità tal-feriti fil-kornea ma tistax tiġi evalwata *per se* fl-assaġġ BCOP, ġie propost, abbażi ta' studji fuq għajnejn il-fniek, li valutazzjoni tal-fond inizjali tal-ferita fil-kornea tista' tintuża biex issir distinzjoni bejn effetti riversibbli u dawk irriversibbli (13). Fl-aħħar nett, il-BCOP ma jippermettix valutazzjoni tal-potenzjal għal tossiċità sistemika assoċjata ma' esponiment tal-għajnejn.

9. Qed isiru sforzi kontinwi sabiex jiġu kkaratterizzati aktar il-limitazzjonijiet tal-assaġġ BCOP kif ukoll kemm huwa utli għall-identifikazzjoni ta' irritanti mhux severi u sustanzi li mhumex irritanti (ara wkoll il-paragrafu 45). L-utenti qed jiġu inkoraġġuti wkoll jipprovdu lill-organizzazzjonijiet tal-validazzjoni b'kampjuni u/jew dejta għal evalwazzjoni formali ta' użi futuri possibbli tal-metodu ta' ttestjar BCOP, inklużi dawk għall-identifikazzjoni ta' irritanti mhux severi u sustanzi li mhumex irritanti.

10. Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment ikun qed jistabbilixxi dan l-assaġġ, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 2. Laboratorju jista' juża dawn is-sustanzi kimiċi biex juri l-kompetenza teknika tiegħu fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar BCOP qabel ma jissottometti dejta tal-assaġġ BCOP għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Il-metodu ta' ttestjar BCOP huwa mudell organotipiku li jipprovdi manutenzjoni fuq perjodu ta' żmien qasir tal-funzjoni fiżjoloġika u bijokimika normali tal-kornea tal-bovini *in vitro*. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-ħsara mis-sustanza tat-test tiġi vvalutata minn kejl kwantitattiv ta' bidliet fl-opaċità u l-permeabilità tal-kornea permezz ta' opaċitometru u spettrofotometru ta' dawl viżibbli, rispettivament. Iż-żewġ tipi ta' kejl jintużaw biex jiġi kkalkulat IVIS, li jintuża biex tiġi assenjata kategorija ta' klassifikazzjoni ta' periklu ta' irritazzjoni *in vitro* għat-tbassir tal-potenzjal tas-sustanza tat-test li tikkawża irritazzjoni fl-għajnejn *in vivo* (ara l-kriterji tad-Deċiżjoni).

▼M2

12. Il-metodu ta' ttestjar BCOP juża kornej iżolati mill-għajnejn ta' bhejjem li jkunu għadhom kemm inqatlu. L-opaċità tal-kornea titkejjel b'mod kwantitattiv bħala l-ammont ta' trażmissjoni ta' dawl minn ġol-kornea. Il-permeabilità titkejjel b'mod kwantitattiv bħala l-ammont ta' żebgħa fluworexxina tas-sodju li jgħaddi min-naħa għall-oħra tal-ħxuna kollha tal-kornea, kif individwat fil-midjum fil-kavità posterjuri. Is-sustanzi tat-test, li jiġu introdotti fil-kavità anterjuri tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea, jiġu applikati fis-superfiċje tal-epitelju tal-kornea. L-Appendiċi 3 tipprovdi deskrizzjoni u dijagramma tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea użat fil-BCOP. L-apparat fejn titqiegħed il-kornea jista' jinxtara minn sorsi differenti jew jista' jinbena.

Is-Sors u l-Età tal-Għajnejn Bovini u l-Għażla tal-Ispeċijiet tal-Annimali

13. Bhejjem mibgħuta l-biċċeriji tipikament jinqatlu jew għall-konsum mill-bniedem inkella għal użi kummerċjali oħra. Bħala sors ta' kornej għall-użu fil-BCOP jintużaw biss l-annimali b'saħħithom li jitqiesu xierqa biex jidħlu fil-katina tal-ikel tal-bniedem. Minħabba li l-bhejjem għandhom skala wiesgħa ta' piżijiet, skont ir-razza, l-età u s-sess, mhemmx piż irrakkomandat għall-annimal meta jiġi biex jinqatel.

14. Meta jintużaw għajnejn minn annimali ta' età differenti jistgħu jirriżultaw varjazzjonijiet fid-dimensjonijiet tal-kornej. Kornej b'dijametru orizzontali > 30,5 mm u valuri tal-ħxuna ċentrali tal-kornea (CCT) ≥ 1 100 µm ġeneralment jinkisbu minn bhejjem li jkollhom aktar minn tmien snin, filwaqt li dawk b'dijametru orizzontali < 28,5 mm u CCT < 900 µm ġeneralment jinkisbu minn bhejjem li jkollhom anqas minn ħames snin (14). Minħabba f'hekk, għajnejn minn bhejjem li jkollhom aktar minn 60 xahar tipikament ma jintużawx. Għajnejn minn bhejjem li jkollhom anqas minn 12-il xahar tradizzjonalment ma ntużawx għaliex l-għajnejn ikunu għadhom qegħdin jiżviluppaw u l-ħxuna tal-kornea u d-dijametru tal-kornea jkunu iżgħar b'mod konsiderevoli minn dawk irrapportati għall-għajnejn mill-bhejjem adulti. Madankollu, l-użu ta' kornej minn annimali żgħar (*i.e.*, ta' età minn 6 xhur sa 12-il xahar) huwa permess minħabba li hemm xi vantaġġi, bħal pereżempju disponibilità akbar, skala dejqa ta' etajiet, u inqas perikli marbuta ma' esponiment potenzjali tal-ħaddiema għall-Enċefalopatija Spongiforma Bovina (15). Minħabba li aktar evalwazzjoni tal-effett tad-daqs jew il-ħxuna tal-kornea fuq is-sensibilità għal sustanzi korruživi u irritanti tkun utli, l-utenti huma inkoraġġuti jirrapportaw stima tal-età u/jew il-piż tal-annimali li jipprovdu l-kornej użati fi studju.

Ġbir u Trasport tal-Għajnejn lejn il-Laboratorju

15. L-għajnejn jinġabru mill-impjegati tal-biċċerija. Sabiex kemm jista' jkun titnaqqas kull tip ta' ħsara fl-għajnejn, kemm dik mekkanika kif ukoll tipi oħra ta' ħsara, l-għajn għandha titneħħa mill-ħofra tagħha mill-aktar fis possibbli wara l-mewt. Sabiex jiġi evitat l-esponiment tal-għajnejn għal sustanzi potenzjalment irritanti, l-impjegati tal-biċċeriji ma għandhomx jużaw deterġenti meta jlaħilħu ras l-annimal.

16. L-għajnejn għandhom jingħaddsu kompletament f'soluzzjoni tal-melħ ekwilibrata ta' Hanks, (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) f'reċipjent ta' daqs adattat, u ttrasportati lejn il-laboratorju b'mod li kemm jista' jkun inaqqas id-deterjorament u/jew il-kontaminazzjoni mill-batterji. Minħabba li l-għajnejn jinġabru waqt il-proċess tal-qatla, dawn jistgħu jiġu esposti għaddemm u għal sustanzi bijoloġiċi oħra, inklużi batterji u mikroorganiżmi oħra. Għalhekk huwa importanti li jiġi żgurat li r-riskju ta' kontaminazzjoni jitnaqqas kemm jista' jkun (*eż.* billi r-reċipjent li jkun fih l-għajnejn jinżamm fuq silġ imxarrab, billi jiżdiedu antibjotiċi fl-HBSS li tintuża għall-ħżin tal-għajnejn waqt it-trasport [*eż.* 100 IU/mL ta' peniċillina u 100 mg/mL ta' streptomiċina]).

▼M2

17. L-intervall tal-ħin li jgħaddi minn meta jinġabru l-għajnejn u l-kornej jintużaw fil-BCOP għandu jitnaqqas kemm jista' jkun (tipikament għandhom jinġabru u jintużaw fl-istess ġurnata) u għandu jintwera li dan ma jikkompromettix ir-riżultati tal-assaġġ. Dawn ir-riżultati huma bbażati fuq il-kriterji tal-għażla għall-għajnejn, kif ukoll ir-reazzjonijiet tal-kontrolli pożittivi u negattivi. L-għajnejn kollha użati fl-assaġġ għandhom ikunu mill-istess grupp ta' għajnejn miġbura f'ġurnata speċifika.

Kriterji tal-Għażla għall-Għajnejn Użati fl-BCOP

18. Malli jaslu fil-laboratorju l-għajnejn jiġu eżaminati bir-reqqa għad-difetti inklużi żieda fl-opaċità, grif u neovaskularizzazzjoni. Għandhom jintużaw biss il-kornej minn għajnejn li ma jkollhom l-ebda difett ta' dan it-tip.

19. Il-kwalità ta' kull kornea tiġi evalwata wkoll fi stadji li jokkorru aktar 'il quddiem fl-assaġġ. Kornej li jkollhom opaċità akbar minn seba' unitajiet ta' opaċità (NOTA: l-opaċitometru għandu jkun ikkalibrat mal-istandards ta' opaċità li jintużaw biex jiġu stabbiliti l-unitajiet ta' opaċità, ara l-Appendiċi 3) wara perjodu inizjali ta' ekwilibrazzjoni ta' siegħa għandhom jintremew.

20. Kull grupp ta' trattament (sustanza tat-test, kontrolli negattivi u pożittivi konkorrenti) jikkonsisti minn minimu ta' tliet għajnejn. Fl-assaġġ BCOP għandhom jintużaw tliet kornej għall-kontroll negattiv. Minħabba li l-kornej kollha jinqatgħu barra mill-globu sħiħ, u jitqiegħdu fil-kavitajiet tal-kornej, il-manipulazzjoni tagħhom tista' tirriżulta f'artefatti fil-valuri tal-opaċità u l-permeabilità tal-kornej individwali (inkluż il-kontroll negattiv). Barra minn hekk, il-valuri tal-opaċità u l-permeabilità mill-kornej tal-kontroll negattiv jintużaw biex jikkoreġu l-valuri tal-opaċità u l-permeabilità tal-kornej tal-oġġett tat-test u l-kornej tal-kontroll pożittiv fil-kalkoli tal-IVIS.

PROĊEDURA

Preparazzjoni tal-Għajnejn

21. Kornej li ma jkollhom l-ebda difett jiġu ddissektjati b'tali mod li jibqa' minn 2 sa 3 ċm ta' xifer tal-isklerotika sabiex jgħin il-manipulazzjoni sussegwenti, u dan isir b'attenzjoni sabiex tiġi evitata kwalunkwe ħsara fl-epitelju u l-endotelju. Kornej iżolati jitqiegħdu f'apparat fejn titqiegħed il-kornea ddisinjat speċjalment għal dan il-għan li jikkonsisti f'kavitajiet anterjuri u posterjuri, li jkunu f'kuntatt mal-ġenb epiteljali u l-ġenb endoteljali tal-kornea, rispettivament. Iż-żewġ kavitajiet jimtlew sax-xifer bil-midjum essenzjali minimu ta' Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM) (l-ewwel il-kavità posterjuri), filwaqt li jiġi żgurat li ma jifformawx bżieżaq. L-apparat imbagħad jiġi kkalibrat għal tal-anqas siegħa f'temperatura ta' 32 ± 1°C sabiex il-kornej jekwilibraw mal-midjum u jiksbu kemm jista' jkun possibbli attività metabolika normali (it-temperatura approssimattiva tas-superfiċje tal-kornea *in vivo* hija 32 °C).

22. Wara l-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, EMEM frisk u msaħħan minn qabel jiżdied fiż-żewġ kavitajiet u jittieħed l-ewwel qari tal-valuri tal-opaċità għal kull kornea. Kwalunkwe kornea li jkollha ħsara makroskopika fit-tessut tagħha (*eż.*, grif, pigmentazzjoni, neovaskularizzazzjoni) jew opaċità > 7 unitajiet ta' opaċità tintrema. L-opaċità medja tal-kornej kollha ekwilibrati tiġi kkalkulata. Minimu ta' tliet kornej b'valuri ta' opaċità qrib il-valur medjan għall-kornej kollha jintgħażlu bħala kornej għall-kontroll negattiv (jew solvent). Il-kornej li jibqa' jiġu ddistribwiti fi grupp ta' trattament u ta' kontroll pożittiv.

▼M2

23. Minħabba li l-kapaċità tas-sħana tal-ilma hija ogħla minn dik tal-arja, l-ilma jipprovdi kundizzjonijiet ta' temperatura aktar stabbli għall-inkubazzjoni. Għalhekk, huwa rrakkomandat l-użu ta' banju tal-ilma sabiex l-apparat fejn titqiegħed il-kornea u l-kontenut tiegħu jinżammu f'temperatura ta' 32 ± 1°C. Madankollu, jistgħu jintużaw ukoll inkubaturi tal-arja, filwaqt li jittieħdu prekawzjonijiet sabiex tinżamm l-istabilità tat-temperatura (*eż.*, billi l-apparat u l-midja jissaħħnu minn qabel).

Applikazzjoni tas-Sustanza tat-Test

24. Jintużaw żewġ protokolli ta' trattament, wieħed għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi (solidi jew likwidi), u ieħor għal solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi.

25. Il-likwidi jiġu ttestjati meta ma jkunux iddilwiti, filwaqt li l-aġenti tensjoattivi jiġu ttestjati f'konċentrazzjoni ta' 10 % w/v f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0,9 %, ilma distillat, jew solvent ieħor li jkun intwera li ma għandu l-ebda effetti avversi fuq is-sistema tat-test. Semisolidi, kremi u x-xema' kollha tipikament jiġu ttestjati bħala likwidi. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xierqa għal konċentrazzjonijiet ta' dilwizzjoni alternattivi. Il-kornej jiġu esposti għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi għal 10 minuti. L-użu ta' ħinijiet oħra ta' esponiment għandu jkun abbażi ta' raġuni xjentifika xierqa.

26. Solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi tipikament jiġu ttestjati bħala soluzzjonijiet jew suspensjonijiet f'konċentrazzjoni ta' 20 % f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0,9 %, ilma distillat, jew solvent ieħor li jkun intwera li ma għandu l-ebda effetti avversi fuq is-sistema tat-test. F'ċerti ċirkostanzi u b'ġustifikazzjoni xjentifika xierqa, is-solidi jistgħu jiġu ttestjati puri b'applikazzjoni diretta fuq is-superfiċje tal-kornea permezz tal-metodu tal-kavità miftuħa (ara l-paragrafu 29). Il-kornej jiġu esposti għas-solidi għal erba' sigħat, iżda bħal ma jsir għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi, jistgħu jintużaw ħinijiet ta' esponiment alternattivi abbażi ta' raġuni xjentifika xierqa.

27. Jistgħu jintużaw metodi ta' trattament differenti, skont in-natura fiżika u l-karatteristiċi kimiċi (*eż.* solidi, likwidi, likwidi viskuży jew mhux viskuży) tas-sustanza tat-test. Il-fattur kritiku huwa li jiġi żgurat li s-sustanza tat-test tkopri b'mod xieraq is-superfiċje tal-epitelju u li titneħħa b'mod xieraq waqt l-istadji tat-tlaħliħ. Metodu tal-kavità magħluqa tipikament jintuża għal sustanzi tat-test li jvarjaw minn likwidi mhux viskuży għal likwidi viskuży ftit, filwaqt li metodu tal-kavità miftuħa tipikament jintuża għal sustanzi tat-test li jvarjaw minn likwidi semiviskuży għal likwidi viskuży u għal solidi puri.

28. Fil-metodu tal-kavità magħluqa, ammont tas-sustanza tat-test (750 µL) li jkun biżżejjed biex ikopri l-kavità anterjuri jiġi introdott minn ġot-toqob tal-iddożar fuq is-superfiċje ta' fuq tal-kavità, u t-toqob sussegwentement jiġu ssiġillati bit-tappieri tal-kavità waqt l-esponiment. Huwa importanti li jiġi żgurat li kull kornea tiġi esposta għas-sustanza tat-test għall-intervall tal-ħin xieraq.

29. Fil-metodu tal-kavità miftuħa, iċ-ċirku li jsakkar it-tieqa u t-tieqa tal-ħġieġ jitneħħew mill-kavità anterjuri qabel ma jibda t-trattament. Il-kontroll jew is-sustanza tat-test (750 µL, jew biżżejjed sustanza tat-test biex tkopri l-kornea kompletament) jiġi/tiġi applikat(a) direttament fuq is-superfiċje tal-epitelju tal-kornea permezz ta' mikropipetta. Jekk sustanza tat-test ma tkunx tista' tiġi ppipettata faċilment, is-sustanza tat-test tista' tinġibed permezz tal-pressjoni f'pipetta bi spostament pożittiv sabiex jiġi ffaċilitat l-iddożar. Il-ponta tal-pipetta bi spostament pożittiv, tiddaħħal fil-ponta tad-distribuzzjoni tas-siringa sabiex il-materjal ikun jista' jinġibed fil-ponta tal-pipetta taħt pressjoni. Imbagħad jeħtieġ li l-pistun tal-pipetta jinġibed 'il fuq fl-istess waqt li l-pistun tas-siringa jingħafas 'l isfel. Jekk fil-ponta tal-pipetta jiffurmaw xi bżieżaq tal-arja, is-sustanza tat-test għandha titneħħa (tinħareġ 'il barra) u l-proċess jiġi ripetut sa mal-ponta timtela mingħajr ma jkun hemm bżieżaq tal-arja. Jekk ikun meħtieġ, tista' tintuża siringa normali (mingħajr labra) minħabba li din tippermetti l-kejl ta' volum akkurat tas-sustanza tat-test u applikazzjoni eħfef fuq is-superfiċje tal-epitelju tal-kornea. Wara l-iddożar, it-tieqa tal-ħġieġ terġa' titqiegħed fuq il-kavità anterjuri biex terġa' tinħoloq sistema magħluqa.

▼M2

Inkubazzjoni wara l-esponiment

30. Wara l-perjodu ta' esponiment, is-sustanza tat-test, is-sustanza tal-kontroll negattiv, jew tal-kontroll pożittiv titneħħa mill-kavità anterjuri u l-epitelju jinħasel tal-anqas tliet darbiet (jew sakemm ma tkun tista' tiġi osservata l-ebda evidenza viżiva tas-sustanza tat-test) bl-EMEM (li jkun fih il-fenol aħmar). Midjum li jkun fih il-fenol aħmar jintuża għat-tlaħliħ minħabba li bidla fil-kulur tal-fenol aħmar tista' tiġi mmonitorjata sabiex tiġi ddeterminata l-effikaċja tat-tlaħliħ ta' materjali aċiduż jew alkalini. Il-kornej jinħaslu aktar minn tliet darbiet jekk il-fenol aħmar jibqa' jibdel il-kulur (isfar jew vjola), jew is-sustanza tat-test tkun għadha viżibbli. Ladarba l-midjum ma jibqagħlux sustanza tat-test, il-kornej jitlaħalħu għall-aħħar darba bl-EMEM (mingħar fenol aħmar). L-EMEM (mingħajr fenol aħmar) jintuża għall-aħħar tlaħliħa sabiex jiġi żgurat li l-fenol aħmar jitneħħa kompletament mill-kavità anterjuri qabel ma titkejjel l-opaċità. Il-kavità anterjuri mbagħad terġa' timtela b'EMEM frisk mingħajr fenol aħmar.

31. Għal-likwidi jew l-aġenti tensjoattivi, wara t-tlaħliħ, il-kornej jiġu inkubati għal sagħtejn oħra f'temperatura ta' 32 ± 1 °C. F'ċerti ċirkostanzi ħin itwal ta' inkubazzjoni wara l-esponiment jista' jkun utli. Dan għandu jitqies skont il-każ. Kornej trattati b'solidi jitlaħalħu kompletament fi tmiem il-perjodu ta' esponiment li jdum erba' sigħat, iżda ma jeħtiġux aktar inkubazzjoni.

32. Fi tmiem il-perjodu ta' inkubazzjoni wara l-esponiment għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi u fi tmiem il-perjodu ta' esponiment ta' erba' sigħat għas-solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi, jiġu rreġistrati l-opaċità u l-permeabilità ta' kull kornea. Barra minn hekk, kull kornea tiġi osservata b'mod viżiv u l-osservazzjonijiet pertinenti jiġu rreġistrati (eż. tqaxxir tat-tessuti, sustanza tat-test residwa, opaċità mhux uniformi). Dawn l-osservazzjonijiet jistgħu jkunu importanti għax jistgħu jiġu riflessi minn varjazzjonijiet fil-qari tal-valuri tal-opaċitometru.

Sustanzi ta' Kontroll

33. Kontrolli negattivi jew tas-solvent/tal-midjum u kontrolli pożittivi jiġu inklużi b'mod konkorrenti f'kull esperiment.

34. Meta sustanza likwida tiġi ttestjata f'100 %, kontroll negattiv (*eż.*, soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0,9 % jew ilma distillat) jiġi inkluż fil-metodu ta' ttestjar BCOP sabiex bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test ikunu jistgħu jiġu individwati u sabiex tiġi pprovduta linja ta' bażi għall-punti tat-tmiem tal-assaġġ. Dan jiżgura wkoll li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx b'mod li mhux xieraq f'reazzjoni irritanti.

35. Meta jiġi ttestjat likwidu dilwit, aġent tensjoattiv jew solidu fil-metodu ta' ttestjar BCOP, b'mod konkorrenti, jiġi inkluż grupp ta' kontroll tas-solvent/tal-midjum sabiex bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test ikunu jistgħu jiġu individwati u sabiex tiġi pprovduta linja ta' bażi għall-punti tat-tmiem tal-assaġġ. Jista' jintuża biss solvent/midjum li jkun intwera li ma għandu l-ebda effett avvers fuq is-sistema tat-test.

36. F'kull esperiment jiġi inkluż irritant għall-għajnejn magħruf sabiex jiġi vverifikat li tkun ġiet ikkawżata reazzjoni xierqa. Minħabba li l-assaġġ BCOP qed jintuża f'dan it-test biex jidentifika sustanzi korrużivi jew irritanti severi, idealment il-kontroll pożittiv għandu jkun sustanza ta' referenza li tipprovoka reazzjoni severa f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tista' tiġi vvalutata, id-daqs tar-reazzjoni irritanti ma għandux ikun eċċessiv.

37. Id-dimetilformammid jew l-idrossidu tas-sodju 1 % huma eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi tat-test likwidi. Eżempju ta' kontroll pożittiv għal sustanzi tat-test solidi huwa l-imidażol 20 % (piż mqabbel mal-volum) f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju 0,9 %.

▼M2

38. Sustanzi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' kimiċi jew prodotti jikkawżaw irritazzjoni għall-għajnejn, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv li sustanza irritanti għall-għajnejn tikkawża irritazzjoni fi ħdan skala speċifika ta' reazzjonijiet ta' sustanzi irritanti.

Punti tat-Tmiem Imkejla

39. L-opaċità tiġi ddeterminata mill-ammont ta' trażmissjoni ta' dawl minn ġol-kornea. L-opaċità tal-kornea titkejjel b'mod kwantitattiv permezz ta' opaċitometru, li jagħti valuri ta' opaċità fuq skala kontinwa.

40. Il-permeabilità tiġi ddeterminata mill-ammont taż-żebgħa fluworexxina tas-sodju li tippenetra s-saffi kollha taċ-ċelluli tal-kornea (*i.e.*, l-epitelju fuq is-superfiċje esterna tal-kornea għal ġol-endotelju fuq is-superfċije interna tal-kornea). 1 mL ta' soluzzjoni ta' fluworexxina tas-sodju (4 jew 5 mg/mL meta jiġu ttestjati likwidi jew aġenti tensjoattivi jew solidi li mhumiex aġenti tensjoattivi, rispettivament) jiżdied fil-kavità anterjuri tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea, li tkun f'kuntatt mal-ġenb epiteljali tal-kornea, filwaqt li l-kavità posterjuri, li tkun f'kuntatt mal-ġenb endoteljali tal-kornea, timtela b'EMEM frisk. L-apparat imbagħad jiġi inkubat f'pożizzjoni orizzontali għal 90 ± 5 minuta f'temperatura ta' 32 ± 1 °C. L-ammont ta' fluworexxina tas-sodju li jgħaddi għal ġol-kavità posterjuri jitkejjel b'mod kwantitattiv permezz ta' spettrofotometru UV/VIS. Kejl spettrofotometriku evalwat f'490 nm jiġi rreġistrat bħala densità ottika (OD_{490}) jew valuri ta' assorbanza li jitkejlu fuq skala kontinwa. Il-valuri ta' permeabilità tal-fluworexxina jiġu ddeterminati bl-użu ta' valuri ta' OD_{490} abbażi ta' spettrofotometru viżibbli li juża traġitt ottiku standard ta' 1 ċm

41. Alternattivament, jista' jintuża qarrej tal-folja tal-mikrotitrazzjoni b'96 bir sakemm; (i) tkun tista' tiġi stabbilita l-iskala ta' valuri lineari tal-qarrej tal-folja għad-determinazzjoni tal-valuri OD_{490}; u (ii), jintuża l-volum korrett ta' kampjuni tal-fluworexxina fuq il-folja ta' 96 bir sabiex jinkisbu valuri ta' OD_{490} ekwivalenti għat-traġitt ottiku standard ta' 1 ċm (dan jista' jkun li jkun jeħtieġ bir mimli kompletament [ġeneralment 360mL]).

DEJTA U RAPPURTAR

Evalwazzjoni tad-Dejta

42. Ladarba l-valuri (OD_{490}) tal-opaċità u l-permeabilità medja jkunu ġew ikkoreġuti għall-opaċità tal-isfond u l-valuri OD_{490} tal-permeabilità tal-kontroll negattiv, il-valuri medji OD_{490} tal-opaċità u l-permeabilità għal kull grupp ta' trattament għandhom jiġu kkombinati f'formula dderivata empirikament sabiex jiġi kkalkulat punteġġ tal-irritanza *in vitro* (IVIS) għal kull grupp ta' trattament kif ġej:

IVIS = valur medju tal-opaċità + (15 × valur OD_{490} medju tal-permeabilità)

Sina *et al.* (16) irrappurtaw li din il-formula ġiet idderivata matul studji interni u bejn laboratorju u ieħor. Id-dejta ġġenerata għal serje ta' 36 kompost fi studju fost bosta laboratorji ġiet soġġetta għal analiżi b'varjabbli mutlipli sabiex tiġi ddeterminata l-ekwazzjoni tal-aqwa adattament bejn id-dejta *in vivo* u dik *in vitro*. Din l-analiżi twettqet minn xjenzati f'żewġ kumpaniji separati, li dderivaw ekwazzjonijiet kważi identiċi.

43. Il-valuri tal-opaċità u tal-permeabilità għandhom jiġu evalwati wkoll b'mod indipendenti sabiex jiġi ddeterminat jekk sustanza tat-test tkunx ipprovokat korrużività jew irritazzjoni severa permezz ta' wieħed biss miż-żewġ punti tat-tmiem (ara l-Kriterji tad-Deċiżjoni).

▼M2

Kriterji tad-Deċiżjoni

44. Sustanza li tipprovoka IVIS ≥ 55,1 tiġi ddefinita bħala sustanza korrużiva jew irritant sever. Skont il-paragrafu 1, jekk is-sustanza tat-test ma tiġix identifikata bħala korrużiva għall-għajnejn jew irritant sever, għandu jitwettaq aktar ittestjar għall-finijiet ta' klassifikazzjoni u ttikkettar. Il-metodu ta' ttestjar BCOP għandu akkuratezza kumplessiva ta' 79 % (113/143) sa 81 % (119/147). rata pożittiva falza ta' 19 % (20/103) sa 21 % (22/103), u rata negattiva falza ta' 16 % (7/43) sa 25 % (10/40), meta mqabbel mad-dejta, tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* li jsir fuq għajnejn il-fniek, ikklassifikata skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-EPA (1), l-UE (2), jew il-GHS (3). Meta sustanzi f'ċerti klassijiet kimiċi (*i.e.*, alkoħols, ketoni) jew fiżiċi (*i.e.*, solidi) ikunu eskluży mill-bażi tad-dejta, l-akkuratezza tal-BCOP skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS tvarja minn 87 % (72/83) sa 92 % (78/85), ir-rati ta' pożittivi foloz ivarjaw minn 12 % (7/58) sa 16 % (9/56), u r-rati ta' negattivi foloz ivarjaw minn 0 % (0/27) sa 12 % (3/26).

45. Anke jekk għas-sustanza tat-test ma tinkiseb l-ebda klassifikazzjoni ta' sustanza korrużiva jew irritant sever għall-għajnejn, id-dejta BCOP tista' tkun utli, flimkien mad-dejta tat-test *in vivo* li jsir fuq għajnejn il-fniek jew minn test *in vitro* vvalidat kif xieraq, sabiex jiġu evalwati aktar il-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar BCOP kif ukoll kemm dan huwa utli għall-identifikazzjoni ta' irritanti li mhumiex severi u sustanzi li mhumex irritanti (qed jiġi żviluppat Dokument ta' Gwida dwar l-użu ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* fuq l-għajnejn).

Kriterji ta' Aċċettazzjoni ta' Studju

46. Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontroll pożittiv jagħti IVIS li jkun fi ħdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika attwali, li tiġi aġġornata tal-anqas kull tliet xhur, jew kull darba li jitwettaq test aċċettabbli f'laboratorji fejn it-testijiet ma jitwettqux b'mod frekwenti (*i.e.*, anqas minn darba fix-xahar). Ir-reazzjonijiet mill-kontroll negattiv jew tas-solvent/tal-midjum għandhom jirriżultaw f'valuri ta' opaċità u permeabilità li jkunu anqas mill-ogħla limiti stabbiliti għall-valuri tal-opaċità u l-permeabilità tal-isfond għall-kornej bovini trattati bil-kontroll negattiv jew tas-solvent/tal-midjum rispettiv.

Rapport tat-Test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi t-tagħrif li ġej, jekk ikun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll

Isem/Ismijiet kimiku/kimiċi pereżempju l-isem strutturali użat mir-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi (CAS), u ismijiet oħra, jekk ikunu magħrufa;

In-Numru tar-Reġistru CAS (RN), jekk ikun magħruf;

Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew it-taħlita (f'perċentwal(i) skont il-piż), sakemm dan it-tagħrif ikun disponibbli;

Proprjetajiet fiżikokimiċi bħall-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, il-klassi kimika, is-solubilità fl-ilma rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

It-trattament tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (*eż.*, it-tisħin, it-ħin);

L-istabilità, jekk tkun magħrufa.

▼M2

Tagħrif dwar l-Isponser u l-Istallazzjoni tat-Test

L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-istallazzjoni tat-test u tad-direttur tal-istudju;

Identifikazzjoni tas-sors tal-għajnejn (*i.e.*, l-istallazzjoni minn fejn inġabru);

Il-kundizzjonijiet tat-trasport u l-ħżin tal-għajnejn (*eż.*, id-data u l-ħin meta nġabru l-għajnejn, l-intervall tal-ħin qabel ma nbeda t-test, il-midja tat-trasport u l-kundizzjonijiet tat-temperatura, kwalunkwe antibijotiku li ntuża);

Jekk disponibbli, karatteristiċi speċifiċi tal-annimali minn fejn inġabru l-għajnejn (*eż.*, età, sess, piż tal-annimal donatur).

Ġustifikazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar u tal-Protokoll Użati

Integrità tal-Metodu ta' Ttestjar

Il-proċedura użata sabiex tiġi żgurata l-integrità (*i.e.*, akkuratezza u affidabilità) tal-metodu ta' ttestjar tul iż-żmien (*eż.*, ittestjar perjodiku ta' sustanzi ta' profiċjenza, użu ta' dejta storika ta' kontrolli negattivi u pożittivi).

Kriterji għal Test Aċċettabbli

Firxiet aċċettabbli ta' kontrolli pożittivi u negattivi konkorrenti bbażati fuq dejta storika;

Jekk applikabbli, firxiet aċċettabbli ta' punti ta' riferiment ta' kontroll konkorrenti bbażati fuq dejta storika.

Kundizzjonijiet tat-Test

Deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata;

Tip ta' apparat li ntuża għat-tqegħid tal-kornea;

Tagħrif dwar kalibrazzjoni għal apparat użat għall-kejl tal-opaċità u l-permeabilità (*eż.*, opaċitometru u spettrometru);

Tagħrif dwar il-kornej bovini użati, inklużi dikjarazzjonijiet rigward il-kwalità tagħhom;

Dettalji tal-proċedura tat-test użata;

Konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test użata;

Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

Referenza għad-dejta storika tal-mudell (*eż.*, kontrolli negattivi u pożittivi, sustanzi ta' profiċjenza, sustanzi ta' riferiment);

Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati.

Riżultati

Tabulazzjoni ta' dejta minn kampjuni individwali tat-test (*eż.*, valuri ta' opaċità u ta' OD_{490} u IVIS ikkalkulati għas-sustanza tat-test u l-kontrolli pożittivi, negattivi u ta' riferiment [jekk inklużi], irrappurtati f'forma tabulari, inkluża dejta minn esperimenti ripetuti ta' replikazzjoni kif ikun xieraq, u medji ± id-devjazzjoni standard għal kull esperiment);

Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati.

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjoni

LETTERATURA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

(2) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.

(3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Disponibbli fuq:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponibbli fuq:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-Reġistrazzjoni, il-Valutazzjoni, l-Awtorizzazzjoni u r-Restrizzjoni ta' Sustanzi Kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni. ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Disponibbli fuq:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibbli fuq:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Din hija miżura tar-rendiment tal-metodu ta' ttestjar u aspett wieħed ta' "rilevanza." It-terminu spiss jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza", biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati pożittivi ta' metodu ta' ttestjar.

Sustanza ta' riferiment: Sustanza użata bħala standard għal paragun ma' sustanza tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi li tkun qed tiġi ttestjata; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fl-iskala tar-reazzjoni mixtieqa.

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-għajn li tkopri l-ħabba tal-għajn u l-pupilla u tħalli d-dawl jgħaddi għal ġol-parti interna tal-għajn.

Opaċità tal-kornea: Kejl tal-estensjoni tal-opaċità tal-kornea wara esponiment għal sustanza tat-test. Żieda fl-opaċità tal-kornea hija indikattiva ta' ħsara fil-kornea. L-opaċità tista' tiġi evalwata b'mod suġġettiv kif isir fit-test Draize li jsir fuq għajnejn il-fniek, jew b'mod oġġettiv bi strument bħal pereżempju "opaċitometru".

Permeabilità tal-kornea: Kejl kwantitattiv tal-ħsara fl-epitelju tal-kornea billi jiġi ddeterminat l-ammont ta' żebgħa fluworexxina tas-sodju li tgħaddi minn ġos-saffi kollha taċ-ċelluli tal-kornea.

Kategorija tal-EPA 1: Korrużiv (qerda irriversibbli tat-tessut tal-kornea) jew involviment tal-kornea jew irritazzjoni li tippersisti għal aktar minn 21 jum (1).

Kategorija tal-UE R41: Produzzjoni ta' ħsara fit-tessut tal-għajn, jew tħassir fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunx kompletament riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni (2).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' pożittivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-ħaddiema tal-emerġenza) u l-ambjent (3).

▼M2

Kategorija tal-GHS 1: Produzzjoni ta' ħsara fit-tessut tal-għajn, jew tħassir fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunx kompletament riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni (3).

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandha l-potenzjal tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub) popolazzjoni jiġi/tiġi espost(a) għal dak l-aġent.

Punteġġ tal-Irritanza *In Vitro* (IVIS): Formula dderivata empirikament użata fl-assaġġ BCOP fejn il-valuri medji tal-opaċità u tal-permeabilità għal kull grupp ta' trattament jiġu kkombinati f'punteġġ *in vitro* wieħed għal kull grupp ta' trattament. L-*IVIS* = valur medju tal-opaċità + (15 x valur medju tal-permeabilità).

Kontroll negattiv: Replikazzjoni mhux trattata li fiha l-komponenti kollha tas-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza tat-test u kampjuni ta' kontroll oħra sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Sustanzi li mhumiex irritanti: Sustanzi li mhumiex ikklassifikati bħala Kategorija I, II, jew III tal-EPA; Kategorija R41 jew R36 tal-UE; jew Kategorija tal-GHS 1, 2A, jew 2B irritanti għall-għajnejn.

Sustanza korrużiva għall-għajnejn: (a) Sustanza li tikkawża ħsara irriversibbli fit-tessut tal-għajn; (b) Sustanzi li huma kklassifikati bħala Kategorija 1 tal-GHS, Kategorija I tal-EPA, jew Kategorija R41 tal-UE irritanti għall-għajnejn (1) (2) (3).

Irritant għall-għajnejn: (a) Sustanza li tipproduċi bidla riversibbli fl-għajn wara li tiġi applikata fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn; (b) Sustanzi li huma kklassifikati bħala Kategorija I jew II tal-EPA, Kategorija R36 tal-UE, jew Kategorija 2A jew 2B tal-GHS irritanti għall-għajnejn (1) (2) (3).

Irritant sever għall-għajnejn: (a) Sustanza li tikkawża ħsara fit-tessut tal-għajn wara li tiġi applikata fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn u li ma titlaqx fi żmien 21 jum tal-applikazzjoni jew tikkawża tħassir fiżiku serju tal-vista; (b) Sustanzi li huma kklassifikati bħala Kategorija 1 tal-GHS, Kategorija I tal-EPA, jew Kategorija R41 tal-UE irritanti għall-għajnejn (1) (2) (3).

Opaċitometru: Strument li jintuża sabiex titkejjel "l-opaċità tal-kornea" billi jevalwa b'mod kwantitattiv it-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-kornea. L-istrument tipiku jkollu żewġ kompartimenti, kull wieħed minnhom b'sors ta' dawl u fotoċellula tiegħu stess. Kompartiment minnhom jintuża għall-kornea trattata, filwaqt li l-ieħor jintuża biex jikkalibra u jiżżera l-istrument. Dawl minn bozza tal-aloġenu jitgħadda minn ġo kompartiment ta' kontroll (kavità vojta mingħajr twieqi jew likwidu) għal ġo fotoċellula u jitqabbel mad-dawl mgħoddi minn ġol-kompartiment sperimentali, fejn tinsab il-kavità li fiha l-kornea, għal ġo fotoċellula. Id-differenza fit-trażmissjoni tad-dawl mill-fotoċelluli titqabbel u valur numeriku ta' opaċità jidher fuq displej diġitali.

Kontroll pożittiv: Replikazzjoni li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-reazzjoni severa ma għandux ikun eċċessiv.

▼M2

Affidabilità: Qies ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq skont l-istess protokoll. Tiġi vvalutatata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Kontroll ta' solvent/midjum: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha tas-sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-midjum li jiġi pproċessat mas-sustanza tat-test trattata u kampjuni ta' kontroll oħra sabiex tiġi stabbilita l-ewwel reazzjoni għall-kampjuni trattati mis-sustanza tat-test maħlula fl-istess solvent jew midjum. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-midjum ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Ittestjar imtarraġ: Strateġija ta' ttestjar pass pass fejn it-tagħrif kollu dwar sustanza tat-test jiġi analizzat f'ordni speċifika, permezz ta' proċess fejn titqies l-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed tagħrif disponibbli għal deċiżjoni ta' klassifikazzjoni ta' periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża irritazzjoni jista' jiġi assenjat abbażi ta' tagħrif eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża irritazzjoni ma jkunx jista' jiġi assenjat abbażi tat-tagħrif eżistenti proċedura ta' ttestjar sekwenzjali pass pass għandha titwettaq fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Metodu ta' ttestjar ivvalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Huwa importanti li wieħed jinnota li metodu ta' ttestjar ivvalidat jista' jkun li ma jkollux rendiment tajjeb biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u affidabilità sabiex jinstab aċċettabli għall-għan propost.

Importanza tal-evidenza: Il-proċess fejn jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' biċċiet ta' informazzjoni varji sabiex tintlaħaq u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza li tkun ta' periklu.

▼M2

Appendiċi 2

Sustanzi ta' profiċjenza għall-metodu ta' ttestjar BCOP

Qabel l-użu ta' rutina ta' metodu ta' ttestjar li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji jista' jkun li jkunu jixtiequ juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-korrużività għall-għajnejn ta' 10 sustanzi rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi ntgħażlu biex jirrappreżentaw l-iskala ta' reazzjonijiet ta' irritazzjoni/korrużjoni fl-għajn, li hija bbażata fuq ir-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TG 405) (*i.e.*, il-Kategoriji 1, 2A, 2B, jew Mhux Ikklassifikata u Ttikkettata skont il-GHS tan-NU (3) (7). Madankollu, meta jitiqies kemm dawn l-assaġġi huma utli b'mod li huwa vvalidat (*i.e.*, biex jiġu identifikati sustanzi korrużivi/irritanti severi għall-għajnejn), hemm biss żewġ riżultati għall-finijiet ta' klassifikazzjoni (sustanza korrużiva/irritant sever jew sustanza mhux korrużiva/irritant mhux sever) biex tintwera l-profiċjenza. Kriterji oħra tal-għażla kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli b'mod kummerċjali, ikun hemm disponibbli dejta ta' referenzi ta' kwalità għolja *in vivo*, u li jkun hemm dejta ta' kwalità għolja miż-żewġ metodi *in vitro* li għalihom qegħdin jiġu żviluppati l-Linji Gwida għall-Ittestjar. Għal din ir-raġuni, sustanzi irritanti ntgħażlu mil-lista rrakkomandata mill-ICCVAM ta' 122 sustanza ta' referenza għall-validazzjoni ta' metodi ta' ttestjar ta' tossiċità għall-għajnejn *in vitro* (ara l-Appendiċi H: Sustanzi ta' Referenza Rrakkomandati mill-ICCVAM) (5). Id-dejta tar-referenzi hija disponibbli fid-Dokumenti ta' Analiżi tal-Isfond tal-ICCVAM għall-metodu ta' ttestjar BCOP u ta' Għajnejn tat-Tiġieġ Iżolati (Isolated Chicken Eye, ICE) (17) (18).

Tabella 1

Sustanzi rrakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika mal-BCOP

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika ([1])	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni *In Vivo* ([2])	Klassifikazzjoni *In Vitro* ([3])
Klorur tal-benżalkonju (5 %)	8001-54-5	Kompost ta' onju	Likwidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Kloressidin	55-56-1	Ammin, Ammidin	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Aċidu dibenżojl-L-tartariku	2743-38-6	Aċidu karbossiliku, Ester	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Imidażol	288-32-4	Eteroċikliku	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
Aċidu trikloroaċetiku (30 %)	76-03-9	Aċidu karbossiliku	Likwidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/Irritant Sever
2,6-diklorobenżojl klorur	4659-45-4	Alid aċil	Likwidu	Kategorija 2A	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Etil-2-metilaċetoaċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2B	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melħ inorganiku	Solidu	Kategorija 2A	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever

▼**M2**

Sustanza	CASRN	Klassi Kimika ([1])	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni *In Vivo* ([2])	Klassifikazzjoni *In Vitro* ([3])
Gliċerol	56-81-5	Alkoħol	Likwidu	Mhux Tikkettat	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
n-essan	110-54-3	Idrokarbonju (aċiliku)	Likwidu	Mhux tikkettat	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever

Taqsiriet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

([1]) Klassijiet kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, abbażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-librerija nazzjonali tal-intestaturi tas-suġġetti mediċi tal-mediċina (MeSH) (disponibbli fuq http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU (3)(7).

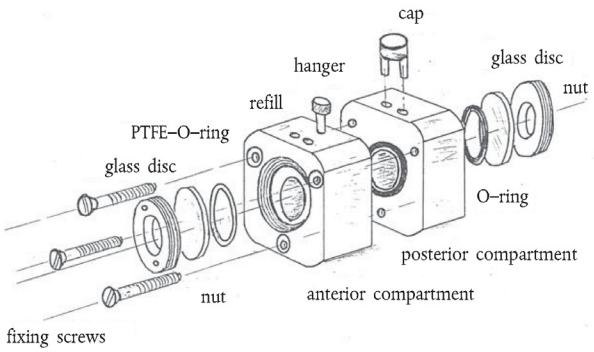
([3]) Abbażi tar-riżultati fil-BCOP u l-ICE.

▼M2

Appendiċi 3

L-APPARAT TAL-BCOP FEJN TITQIEGĦED IL-KORNEA

1. L-apparat tal-BCOP fejn titqiegħed il-kornea huwa magħmul minn materjal inerti (*eż.*, polipropilen). L-apparat huwa magħmul minn żewġ nofsijiet (kavità anterjuri u oħra posterjuri), u għandu żewġ kavitajiet interni ċilindriċi simili. Kull kavità tesa' volum ta' 5 mL u hija magluqa b'tieqa tal-ħġieġ, li minn ġo fiha jiġi rreġistrat il-kejl tal-opaċità. Kull waħda mill-kavitajiet interni hija ta' dijametru ta' 1,7 ċm u fond ta' 2,2 ċm ([1]). Iċ-ċirku-o jitqiegħed fil-kavità posterjuri biex jipprevjeni kwalunkwe tnixxija. Il-kornej jitqiegħdu bil-parti tal-endotelju tħares 'l isfel fuq iċ-ċirku-o tal-kavitajiet posterjuri u l-kavitajiet anterjuri jitqiegħdu fuq il-parti tal-epitelju tal-kornej. Il-kavitajiet jinżammu f'posthom permezz ta' tliet viti li jinsabu fuq it-truf esterni tal-kavità. Fl-aħħar parti ta' kull kavità nsibu tieqa tal-ħġieġ li tista' titneħħa sabiex ikun hemm aċċess faċli għall-kornea. Ċirku-o jitqiegħed ukoll bejn it-tieqa tal-ħġieġ u l-kavità biex jipprevjeni kwalunkwe nixxija. Żewġ toqbiet fil-parti ta' fuq ta' kull kavità jippermettu l-introduzzjoni u t-tneħħija tal-midjum u l-komposti tat-test. Dawn jingħalqu b'tappijiet tal-lastku waqt il-perjodi ta' trattament u ta' inkubazzjoni.



Glossarju

Glass disc: Disk tal-ħġieġ

PTFE-O-ring: Ċirku-O tal-PTFE

Refill: Ftuħ għall-mili

Hanger: Ganċ

Cap: Tapp

Nut: Skorfina

O-ring: Ċirku-O

Posterior compartment: Kompartiment posterjuri

Anterior compartment: Kompartiment anterjuri

Fixing screws: Viti għat-twaħħil

([1]) Id-dimensjonijiet provduti huma bbażati fuq apparat fejn titqiegħed il-kornea li jintuża għal baqar ta' età li tvarja minn 12-il xahar sa 60 xahar. Fl-eventwalità li jintużaw annimali ta' età minn 4 xhur sa 12-il xahar, l-apparat minflok ikollu jiġi ddisinjat b'tali mod li kull kavità tesa' volum ta' 4 mL, u kull waħda mill-kavitajiet interni tkun ta' dijametru ta' 1,5 ċm u fond ta' 2,2 ċm. Fi kwalunkwe apparat iddisinjat ġdid fejn titqiegħed il-kornea, ,huwa importanti ħafna li l-proporzjon tal-erja tas-superfiċje tal-kornea esposta mal-volum tal-kavità posterjuri ikun daqs il-proporzjon fl-apparat tradizzjonali. Dan huwa meħtieġ sabiex jiġi żgurat li l-valuri tal-permeabilità jiġu ddeterminati b'mod korrett għall-kalkolu tal-IVIS permezz tal-formula proposta.

▼**M2**

L-OPAĊITOMETRU

2. L-opaċitometru huwa apparat li jkejjel it-trażmissjoni tad-dawl. Dawl minn bozza tal-aloġenu jitgħadda minn ġo kompartiment ta' kontroll (kavità vojta mingħajr twieqi jew likwidu) għal ġo fotoċellula u jitqabbel mad-dawl mgħoddi minn ġol-kompartiment sperimentali, fejn tinsab il-kavità li fiha l-kornea, għal ġo fotoċellula. Id-differenza fit-trażmissjoni tad-dawl mill-fotoċelluli titqabbel u valur numeriku ta' opaċità jidher fuq displej diġitali. L-unitajiet tal-opaċità huma stabbiliti.

3. L-opaċitometru għandu jipprovdi reazzjoni lineari minn skala ta' qari ta' valuri ta' opaċità li jkopru l-valuri tal-limiti użati għal klassifiki differenti deskritti mill-Mudell ta' Previżjoni (*i.e.*, sal-valur tal-limitu li jindika korrużività/irritanza severa). Sabiex jiġi żgurat qari ta' valuri lineari u akkurat sa 75-80 unitajiet ta' opaċità, jeħtieġ li l-opaċitometru jiġi kkalibrat bl-użu ta' serje ta' kalibraturi. Il-kalibraturi (folji opaki tal-poliester) jitqiegħdu fil-kavità tal-kalibrazzjoni (kavità tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea ddisinjata biex takkomoda l-kalibraturi) u jinqraw fuq l-opaċitometru. Il-kavità tal-kalibrazzjoni hija ddisinjata b'tali mod li l-kalibraturi jinżammu bejn wieħed u ieħor fl-istess distanza bejn id-dawl u l-fotoċellula fejn ikunu se jitqiegħdu l-kornej waqt il-kejl tal-opaċità. L-opaċitometru l-ewwel jiġi kkalibrat għal 0 unitajiet ta' opaċità bl-użu tal-kavità tal-kalibrazzjoni mingħajr kalibratur. Imbagħad tliet kalibraturi differenti jitqiegħdu fil-kavità tal-kalibrazzjoni wieħed wieħed u jitkejlu l-opaċitajiet. Il-kalibraturi 1, 2 u 3 għandhom jirriżultaw f'qari ta' valuri li jkun ugwali għall-valuri stabbiliti tagħhom ta' 75, 150, u 225 unitajiet ta' opaċità, rispettivament, ± 5 %.

▼M2

B. 48 METODU TA' TTESTJAR TA' GĦAJNEJN TAT-TIĠIEĠ IŻOLATI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' SUSTANZI KORRUŻIVI U IRRITANTI SEVERI GĦALL-GĦAJNEJN

DAĦLA

1. Il-metodu ta' ttestjar ta' Għajnejn tat-Tiġieġ Iżolati (ICE) huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuża, f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi, sabiex sustanzi u taħlitiet jiġu kklassifikati bħala sustanzi korrużivi u irritanti severi għall-għajnejn (1) (2) (3). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, irritanti severi huma ddefiniti bħala dawk li jikkawżaw leżjonijiet fl-għajnejn li jippersistu fil-fenek għal tal-anqas 21 jum wara l-amministrazzjoni. Filwaqt li ma jitqiesx validu bħala sostituzzjoni kompluta għat-test *in vivo* li jsir fuq għajnejn il-fniek, l-ICE huwa rrakkomandat biex jintuża bħala strateġija ta' ttestjar imtarraġ għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar regolatorji fi ħdan dominju speċifiku ta' applikabilità (4) (5). Is-sustanzi u t-taħlitiet tat-test (6) li jkunu pożittivi fl-assaġġ jistgħu jiġu kklassifikati bħala sustanzi korrużivi jew irritanti severi għall-għajnejn mingħajr ma jsir aktar ittestjar fuq il-fniek. Sustanza li tagħti riżultat negattiv tkun teħtieġ li tiġi ttestjata fuq il-fniek permezz ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali, kif deskritt fil-Linja Gwida għall-Ittestjar tal-OECD 405 (7) (il-kapitolu B.5 ta' dan l-Anness).

2. L-għan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza tat-test li tikkawża korrużività jew irritanza severa potenzjali kif imkejla mill-ħila tas-sustanza li tikkawża tossiċità f'għajn ta' tiġieġa mneħħija mill-ħofra tagħha. Effetti tossiċi għall-kornea jitkejlu permezz ta' (i) valutazzjoni kwalitattiva tal-opaċità, (ii) valutazzjoni kwalitattiva tal-ħsara għall-epitelju abbaži tal-applikazzjoni tal-fluworexxina fl-għajn (żamma tal-fluworexxina), (iii) kejl kwantitattiv ta' żieda fil-ħxuna (neħa), u (iv) evalwazzjoni kwalitattiva ta' ħsara morfoloġika makroskopika fis-superfiċje. Il-valutazzjonijiet tal-opaċità, tan-neħa, u tal-ħsara fil-kornea wara l-esponiment għal sustanza tat-test jiġu vvalutati b'mod individwali u jiġu kkombinati sabiex tiġi dderivata Klassifikazzjoni tal-Irritanza għall-Għajnejn.

3. L-irritanti għall-għajnejn li jikkawżaw leżjonijiet li jitilqu f'anqas minn 21 jum u sustanzi li mhumiex irritanti ġew ittestjati wkoll bl-użu tal-metodu ta' ttestjar ICE. Madankollu, l-akkuratezza u l-kredibilità tal-metodu ta' ttestjar ICE għas-sustanzi f'dawn il-kategoriji ma ġewx evalwati b'mod formali.

4. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

5. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll tal-metodu ta' ttestjar ICE tal-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interaġenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM) (8), li ġie żviluppat b'segwitu għal studju ta' validazzjoni internazzjonali (4) (5) (9), b'kontribuzzjonijiet mingħand iċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Ċentru Ġappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi, u l-Kwalità tal-Ħajja TNO tad-Dipartiment tat-Tossikoloġija u Farmakoloġija Applikata (il-Pajjiżi l-Baxxi). Il-protokoll huwa bbażat fuq tagħrif miksub minn protokolli ppubblikati, kif ukoll il-protokoll attwali użat mit-TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Il-limitazzjonijiet identifikati għal dan il-metodu huma bbażati fuq ir-rata ta' pożittivi foloz għall-alkoħols u r-rata ta' negattivi foloz għas-solidi u l-aġenti tensjoattivi (ara l-paragrafu 47) (4). Meta s-sustanzi ta' dawn il-klassijiet kimiċi u fiżiċi jiġu eskluży mill-bażi tad-dejta, l-akkuratezza tal-ICE skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS titjieb b'mod sostanzjali (4). Abbażi tal-għan ta' dan l-assaġġ (*i.e.*, li jidentifika biss is-sustanzi korrużivi/irritanti severi għall-għajnejn), rati ta' negattivi foloz mhumiex kritiċi minħabba li tali sustanzi sussegwentement jiġu ttestjati fuq il-fniek jew b'testijiet oħra *in vitro* vvalidati b'mod xieraq, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali b'approċċ ibbażat fuq l-importanza tal-evidenza. Barra minn hekk, il-bażi tad-dejta tal-validazzjoni attwali ma tippermettix evalwazzjoni xierqa ta' wħud mill-klassijiet kimiċi jew tal-prodotti (*eż.*, it-taħlitiet). Madankollu, l-investigaturi jistgħu jqisu li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar tat-tipi kollha ta' materjali (inkluż t-taħlitiet), fejn riżultat pożittiv ikun jista' jiġi aċċettat bħala indikattiv ta' reazzjoni għal sustanza korrużiva jew irritant sever għall-għajnejn. Madankollu, riżultati pożittivi miksuba bl-alkoħols għandhom jiġu interpretati b'ċertu kawtela minħabba r-riskju ta' tbassir żejjed.

7. Il-proċeduri kollha li jinvolvu għajnejn tat-tiġieġ għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri applikabbli tal-istallazzjoni tal-ittestjar f'dak li għandu x'jaqsam mal-manipulazzjoni ta' materjali derivati mill-bnedmin jew l-annimali, li jinkludu, iżda li mhumiex limitati għal, tessuti u fluwidi tat-tessuti. Il-prekawzjonijiet universali tal-laboratorji huma rrakkomandati (15).

8. Limitazzjoni tal-metodu ta' ttestjar hija dik li, għalkemm il-metodu jqis uħud mill-effetti fuq l-għajnejn evalwati fil-metodu ta' ttestjar tal-irritanza f'għajnejn il-fenek u sa ċertu punt is-severità tagħhom, il-metodu ma jqisx feriti fil-konġuntiva u fil-ħabba tal-għajnejn. Barra dan, għalkemm ir-riversibilità tal-feriti fil-kornea ma tistax tiġi evalwata *per se* fl-assaġġ ICE, ġie propost, abbażi ta' studji fuq għajnejn il-fniek, li valutazzjoni tal-fond inizjali tal-ferita fil-kornea tista' tintuża biex issir distinzjoni bejn effetti riversibbli u dawk irriversibbli (16). Fl-aħħar nett, il-metodu ta' ttestjar ICE ma jippermettix valutazzjoni tal-potenzjal għal tossiċità sistemika assoċjata ma' esponiment tal-għajnejn.

9. Qed isiru sforzi kontinwi sabiex jiġu kkarratterizzati aktar il-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar ICE kif ukoll kemm huwa utli għall-identifikazzjoni ta' irritanti li mhumiex severi u sustanzi li mhumex irritanti (ara wkoll il-paragrafu 48). L-utenti qed jiġu inkoraġġuti wkoll jipprovdu lill-organizzazzjonijiet ta' validazzjoni b'kampjuni u/jew dejta għal evalwazzjoni formali ta' użi futuri possibbli tal-metodu ta' ttestjar ICE, inklużi dawk għall-identifikazzjoni ta' irritanti li mhumiex severi u sustanzi li mhumex irritanti għall-għajnejn.

10. Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment ikun qed jistabbilixxi dan l-assaġġ, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 2. Laboratorju jista' juża dawn is-sustanzi kimiċi biex juri l-kompetenza teknika tiegħu fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar ICE qabel ma jissottometti dejta tal-ICE għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Il-metodu ta' ttestjar ICE huwa mudell organotipiku li jipprovdi manutenzjoni fuq terminu ta' żmien qasir fuq għajnejn it-tiġieġ *in vitro*. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-ħsara mis-sustanza tat-test tiġi vvalutata bid-determinazzjoni tan-nefħa, l-opaċità u ż-żamma tal-fluworexxina fil-kornea. Filwaqt li l-aħħar żewġ parametri jinvolvu valutazzjoni kwalitattiva, analiżi tan-nefħa fil-kornea tipprovdi valutazzjoni kwantitattiva. Kull kejl jew jinqaleb għal punteġġ kwantitattiv li jintuża għall-kalkolu ta' Indiċi ta' Irritazzjoni kumplessiv, inkella jiġi assenjat kategorizzazzjoni kwantitattiva li tintuża biex tiġi assenjata klassifikazzjoni tal-korrużività u l-irritanza severa għall-għajnejn *in vitro*. Kull wieħed minn dawn ir-riżultati mbagħad ikun jista' jintuża biex jipprevedi l-potenzjal ta' sustanza tat-test li tikkawża korrużività u irritanza severa għall-għajnejn *in vivo* (ara l-Kriterji tad-Deċiżjoni).

▼M2

Sors u Età ta' Għajnejn it-Tiġieġ

12. Storikament, għal dan l-assaġġ intużaw għajnejn li jkunu ttieħdu mit-tiġieġ minn biċċerija fejn jinqatlu għall-konsum mill-bniedem, u b'hekk ġiet eliminata l-ħtieġa ta' annimali tal-laboratorju. Jintużaw biss għajnejn ta' annimali b'saħħithom li huma xierqa li jidħlu fil-katina alimentari tal-bniedem.

13. Għalkemm ma twettaq l-ebda studju kontrollat għall-valutazzjoni tal-età ideali tat-tiġieġ, l-età u l-piż tat-tiġieġ użati storikament f'dan il-metodu ta' ttestjar huma dawk ta' tiġieġ tar-rebbiegħa li tradizzjonalment jiġu pproċessati minn biċċerija tat-tjur (*i.e.*, bejn wieħed u ieħor ta' età ta' 7 ġimgħat, u piż ta' 1,5 – 2,5 kg).

Ġbir u Trasport tal-Għajnejn lejn il-Laboratorju

14. L-irjus għandhom jitneħħew immedjatament wara s-sedazzjoni tat-tiġieġ, ġeneralment b'xokk elettriku u inċiżjoni tal-għonq għall-fsada. Għandu jiġi lokalizzat sors lokali ta' tiġieġ qrib il-laboratorju sabiex l-irjus tat-tiġieġ jiġu ttrasferiti mill-biċċerija sal-laboratorju malajr biżżejjed sabiex kemm jista' jkun jonqos/tonqos id-deterjoramnet u/jew il-kontaminazzjoni mill-batterji. L-intervall tal-ħin li jgħaddi minn meta jinġabru l-irjus tat-tiġieġ u l-għajnejn jintużaw fil-metodu ta' ttestjar ICE għandu jitnaqqas kemm jista' jkun (tipikament fi żmien sagħtejn) u għandu jintwera li dan ma jikkompromettix ir-riżultati tal-assaġġ. Dawn ir-riżultati huma bbażati fuq il-kriterji tal-għażla għall-għajnejn, kif ukoll ir-reazzjonijiet tal-kontrolli pożittivi u negattivi. L-għajnejn kollha użati fl-assaġġ għandhom ikunu mill-istess grupp ta' għajnejn miġbura f'ġurnata speċifika.

15. Minħabba l-fatt li l-għajnejn jiġu ddissektjati fil-laboratorju, l-irjus intatti jiġu ttrasportati mill-biċċerija f'temperatura ambjentali f'kaxex tal-plastik umdifikati b'xugamani mxarrba b'soluzzjoni iżotonika ta' ilma bil-melħ.

Kriterji tal-Għażla għall-Għajnejn Użati fl-ICE

16. Għajnejn li jkollhom punteġġ għoli ta' titbigħ bil-fluworexxina (*i.e.*, > 0,5) jew punteġġ għoli ta' opaċità fil-kornea (*i.e.*, > 0,5) wara li jitneħħew millħofra tal-għajn jitwarrbu.

17. Kull grupp ta' trattament u kontroll pożittiv konkorrenti jikkonsisti minn tal-anqas tliet għajnejn. Il-grupp ta' kontrolli negattivi jew il-kontroll tas-solvent (jekk jintuża solvent li ma jkunx ilma bil-melħ) jikkonsisti minn tal-anqas għajn waħda.

PROĊEDURA

Preparazzjoni tal-Għajnejn

18. Tebqet il-għajn tinqata' barra b'ħafna attenzjoni sabiex ma ssir l-ebda ħsara fil-kornea. L-integrità tal-kornea tiġi vvalutata malajr b'qatra fluworexxina tas-sodju 2 % (w/v) li tiġi applikata fuq is-superfiċje tal-kornea għal ftit sekondi, u mbagħad titlaħlaħ b'soluzzjoni iżotonika ta' ilma bil-melħ. Għajnejn trattati bil-fluworexxina mbagħad jiġu eżaminati b'mikroskopju tal-kornea sabiex jiġi żgurat li l-kornea ma jkollha l-ebda ħsara (*i.e.*, punteġġi taż-żamma tal-fluworexxina u tal-opaċità tal-kornea ≤ 0,5).

19. Jekk l-għajn ma jkollha l-ebda ħsara tinqata' aktar, 'il barra mill-kranju b'attenzjoni kbira sabiex ma ssir l-ebda ħsara lill-kornea. Il-boċċa tal-għajn tinġibed mill-orbita billi wieħed iżomm sod il-membrana tat-tegħmiż b'forċipi kirurġiċi, u l-muskoli tal-għajn jinqatgħu b'imqass mgħawweġ u b'ponta spuntata. Huwa importanti li wieħed jevita li jikkawża ħsara fil-kornea minħabba pressjoni eċċessiva (*i.e.*, artefatti ta' kompressjoni.)

20. Meta l-għajn titneħħa mill-orbita, porzjon viżibbli tan-nerv ottiku għandu jibqa' mwaħħal. Ladarba titneħħa mill-orbita, l-għajn titqiegħed fuq kuttunar assorbenti u l-membrana tat-tegħmiż u tessut konnettiv ieħor jinqatgħu.

▼M2

21. L-għajn imneħħija mill-ħofra tagħha titqiegħed fuq klamp tal-azzar li ma jissaddadx b'tali mod li l-kornea tkun f'pożizzjoni vertikali. Il-klamp imbagħad jiġi ttrasferit f'kavità fl-apparat tas-superfużjoni (16). Il-klampi għandhom jitqiegħdu fl-apparat tas-superfużjoni b'tali mod li l-kornea kollha tkun qed tiġi provduta bid-dripp tas-soluzzjoni iżotonika tal-ilma bil-melħ. Il-kavitajiet tal-apparat tas-superfużjoni għandu jkollu temperatura kkontrollata ta' 32 ± 1,5 °C. L-Appendiċi 3 jipprovdi dijagramma ta' apparat tipiku tas-superfużjoni u l-klampi tal-għajnejn, li jistgħu jinxtraw jew jinbnew. L-apparat jista' jitbiddel sabiex jissodisfa l-ħtiġijiet ta' laboratorju individwali (*eż.*, biex jakkomoda għadd differenti ta' għajnejn).

22. Wara li jitqiegħdu fl-apparat tas-superfużjoni, l-għajnejn jerġgħu jiġu eżaminati b'mikroskopju tal-kornea sabiex jiġi żgurat li ma tkun saritilhom l-ebda ħsara waqt il-proċedura tad-dissezzjoni. Il-ħxuna tal-kornea fil-quċċata tal-kornea għandha titkejjel ukoll issa bl-użu tal-apparat li jkejjel il-fond fuq il-mikroskopju tal-kornea. Għajnejn; (i) b'punteġġ ta' żamma ta' fluworexxina ta' > 0,5; (ii) opaċità tal-kornea > 0,5; jew, (iii), kwalunkwe sinjal addizzjonali ta' ħsara għandhom jiġu ssostitwiti. Għal għajnejn li ma jitwarrbux abbażi ta' kwalunkwe minn dawn il-kriterji, għajnejn individwali bi ħxuna tal-kornea li tiddevja b'aktar minn 10 % mill-valur medju għall-għajnejn kollha għandhom jitwarrbu. L-utenti għandhom ikunu konxji li l-mikroskopji tal-kornea jistgħu jagħtu kejl differenti ta' ħxuna tal-kornea jekk is-setting tal-wisa' tal-feṭħa tkun differenti. Il-wisa' tal-feṭħa għandha tkun immontata għal 0,095 mm.

23. Ladarba l-għajnejn kollha jiġu eżaminati u approvati, l-għajnejn jiġu inkubati għal madwar 45 sa 60 minuta sabiex jiġu ekwilibrati mas-sistema tat-test qabel l-iddożar. Wara l-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, jiġi rreġistrat il-punt żero ta' referenza għall-ħxuna u l-opaċità tal-kornea sabiex iservi bħala linja ta' bażi (*i.e.*, ħin = 0). Il-punteġġ tal-fluworexxina ddeterminat fid-dissezzjoni jintuża bħala l-ewwel kejl għal dak il-punt tat-tmiem.

Applikazzjoni tas-Sustanza tat-Test

24. Eżatt wara l-kejl tal-punt żero ta' referenza, l-għajn (fl-apparat fejn titqiegħed) titneħħa mill-apparat tas-superfużjoni, titqiegħed f'pożizzjoni orizzontali, u s-sustanza tat-test tiġi applikata fuq il-kornea.

25. Sustanzi tat-test likwidi tipikament jiġu ttestjati mhux iddilwiti, iżda jistgħu jiġu ddilwiti jekk dan jitqies neċessarju (*eż.*, bħala parti mit-tfassil tal-istudju). Is-solvent preferut għas-sustanzi dilwiti huwa l-ilma bil-melħ fiżjoloġiku. Madankollu, solventi alternattivi jistgħu jintużaw ukoll taħt kundizzjonijiet kontrollati, iżda għandu jintwera li dawn ikunu solventi xierqa biex jintużaw minflok l-ilma bil-melħ fiżjoloġiku.

26. Sustanzi tat-test likwidi jiġu applikati fuq il-kornea b'tali mod li s-superfiċje sħiħa tal-kornea tkun miksija b'mod indaqs bis-sustanza tat-test; il-volum standard huwa 0,03 mL.

27. Jekk possibbli, is-sustanzi solidi għandhom jintaħnu f'mehrież u lida, sa ma jkunu kemm jista' jkun fini, jew f'għodda tat-ħin komparabbli. It-trab jiġi applikat fuq il-kornea b'tali mod li l-kornea tkun miksija b'mod uniformi bis-sustanza tat-test; l-ammont standard huwa 0,03 gm.

28. Is-sustanza tat-test (likwida jew solida) tiġi applikata għal 10 sekondi u mbagħad titlaħlaħ minn fuq l-għajn bl-ilma bil-melħ iżotoniku (madwar 20 mL) f'temperatura ambjentali. L-għajn (fl-apparat fejn titqiegħed) imbagħad terġa' titqiegħed fl-apparat tas-superfużjoni fil-pożizzjoni wieqfa oriġinali.

Sustanzi ta' Kontroll

29. Kontrolli negattivi jew tas-solvent/midjum konkorrenti għandhom jiġu inklużi f'kull esperiment.

▼M2

30. Meta jkunu qed jiġu ttestjati likwidi f'100 % jew solidi, jintuża ilma bil-melħ fiżjoloġiku bħala kontroll negattiv konkorrenti fil-metodu ta' ttestjar ICE sabiex jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test, u sabiex jiġi żgurat li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx bla bżonn f'reazzjoni irritanti.

31. Meta jkunu qed jiġu ttestjati likwidi ddilwiti, fil-metodu ta' ttestjar ICE jiġi inkluż grupp ta' kontrolli tas-solvent/midjum konkorrenti sabiex jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test, u sabiex jiġi żgurat li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx bla bżonn f'reazzjoni irritanti. Skont il-paragrafu 25, jista' jintuża biss solvent/midjum li jkun intwera li ma jkollu l-ebda effett avvers fuq is-sistema tat-test.

32. F'kull esperiment jiġi inkluż irritant għall-għajnejn magħruf sabiex jiġi vverifikat li tkun ġiet ikkawżata reazzjoni xierqa. Minħabba li l-assaġġ ICE qed jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jidentifika sustanzi korrużivi jew irritanti severi, il-kontroll pożittiv għandu jkun sustanza ta' referenza li tikkawża reazzjoni severa f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-reazzjoni severa ma għandux ikun eċċessiv. Għandha tiġi ġġenerata biżżejjed dejta *in vitro* għall-kontroll pożittiv sabiex għall-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi kkalkulata skala ta' valuri ddefiniti statistikament li tkun aċċettabbli. Jekk ma jkunx hemm disponibbli dejta storika xierqa tal-metodu ta' ttestjar ICE għal kontroll pożittiv partikolari, jista' jkun meħtieġ li jitwettqu studji li jipprovdu dan it-tagħrif.

33. Eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi tat-test likwidi huma l-aċidu aċetiku 10 % jew il-klorur tal-benżalkonju 5 %, filwaqt li eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi tat-test solidi huma l-idrossidu tas-sodju jew l-imidażol.

34. Sustanzi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' kimiċi jew prodotti jikkawżaw irritazzjoni għall-għajnejn, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv li sustanza irritanti għall-għajnejn tikkawża irritazzjoni fi ħdan skala speċifika ta' reazzjonijiet ta' sustanzi irritanti.

Punti tat-Tmiem Imkejla

35. Il-kornej trattati jiġu evalwati qabel it-trattament u mbagħad fit-30, fil-75, fil-120, fil-180 u fil-240 minuta (± 5 minuti) wara t-tlaħliħa ta' wara t-trattament. Dawn il-punti tal-ħin jipprovdu għadd xieraq ta' kejl tul il-perjodu tat-trattament ta' erba' sigħat, filwaqt li jħallu biżżejjed ħin jgħaddi bejn kejl u ieħor sabiex isiru l-osservazzjonijiet neċessarji li għandhom isiru għall-għajnejn kollha.

36. Il-punti tat-tmiem evalwati għall-opaċità, nefħa, żamma tal-fluworexxina fil-kornea u l-effetti morfoloġiċi (*eż.*, tħaffir jew illaxkar tal-epitelju). Il-punti tat-tmiem kollha, bl-eċċezzjoni taż-żamma tal-fluworexxina (li tiġi ddeterminata biss qabel it-trattament u 30 minuta wara l-esponiment għas-sustanza tat-test) jiġu ddeterminati f'kull wieħed mill-punti tal-ħin imsemmija hawn fuq.

37. It-teħid ta' ritratti huwa rrakkomandat għad-dokumentazzjoni tal-opaċità, iż-żamma tal-fluworexxina, l-effetti morfoloġiċi fil-kornea u, jekk issir, l-istopatoloġija.

38. Wara l-eżami finali li jsir fir-raba' siegħa, l-utenti huma inkoraġġuti jippreservaw l-għajnejn f'fissattiv xieraq (*eż.*, soluzzjoni buffer ta' formalina newtrali) għal eżami istopatoloġiku possibbli.

▼**M2**

39. In-nefħa fil-kornea tiġi ddeterminata mill-kejl tal-ħxuna fil-kornea li jsir permezz ta' pakimetru ottiku fuq mikroskopju tal-kornea. In-nefħa tiġi espressa bħala perċentwal u tiġi kkalkulata mill-kejl tal-ħxuna tal-kornea skont il-formula li ġejja:

$$\left[\frac{\textit{ħxuna kornea ħin } t \; - \; \textit{ħxuna kornea ħin } \; = \; 0}{\textit{ħxuna kornea ħin } \; = \; 0}\right] \times 100$$

40. Il-perċentwal medju tan-nefħa fil-kornea għat-testijiet kollha tal-għajnejn jiġi kkalkulat għall-punti tal-ħin ta' osservazzjoni kollha. Abbażi tal-ogħla punteġġ medju għan-nefħa fil-kornea, kif jiġi osservat fi kwalunkwe punt tal-ħin, jingħata punteġġ tal-kategorija għal kull sustanza tat-test.

41. Għall-punteġġ l-opaċità fil-kornea tiġi kkalkulata skont il-parti tal-kornea li tkun opaċifikata l-aktar. Il-valur medju tal-opaċità fil-kornea għat-testijiet kollha tal-għajnejn jiġi kkalkulat għall-punti tal-ħin ta' osservazzjoni kollha. Abbażi tal-ogħla punteġġ medju għall-opaċità fil-kornea, kif jiġi osservat fi kwalunkwe punt tal-ħin, jingħata punteġġ tal-kategorija għal kull sustanza tat-test (it-Tabella 1).

Tabella 1

Punteġġi tal-opaċità tal-kornea

Punteġġ	Osservazzjoni
0	L-ebda opaċità
0,5	Opaċità ħafifa ħafna
1	Partijiet mifruxa jew imxerrda; id-dettalji tal-ħabba tal-għajn jidhru b'mod ċar
2	Parti traslużida li tintlemaħ faċilment; id-dettalji tal-ħabba tal-għajn huma kemxejn oskuri
3	Opaċità severa fil-kornea; ma jidher l-ebda dettall speċifiku tal-ħabba tal-għajn; id-daqs tal-pupilla bilkemm jintlemaħ
4	Opaċità totali fil-kornea; il-ħabba tal-għajn hija inviżibbli

42. Il-valur medju taż-żamma tal-fluworexxina għat-testijiet kollha tal-għajnejn jiġi kkalkulat biss għall-punt tal-ħin osservat fit-30 minuta, li jintuża għall-punteġġ kumplessiv tal-kategorija għal kull sustanza tat-test (it-Tabella 2).

Tabella 2

Punteġġi taż-żamma tal-fluworexxina

Punteġġ	Osservazzjoni
0	L-ebda żamma ta' fluworexxina
0,5	Titbiegħ żgħir ħafna ta' ċelluli singli
1	It-titbiegħ taċ-ċelluli singli mifrux mal-parti ttrattata tal-kornea
2	Titbiegħ ta' ċelluli singli dens fokali jew konfluwenti
3	Partijiet kbar konfluenti tal-kornea jżommu l-fluworexxina

▼M2

43. Effetti morfoloġiċi inkluż “tħaffir” taċ-ċelluli tal-epitelju tal-kornea, “illaxkar” tal-epitelju, “taħrix” tas-superfiċje tal-kornea u “twaħħil” tas-sustanza tat-test mal-kornea. Dawn is-sejbiet jistgħu jvarjaw fis-severità u jistgħu jokkorru b'mod simultanju. Il-klassifikazzjoni ta' dawn is-sejbiet hija suġġettiva skont l-interpretazzjoni tal-investigatur.

DEJTA U RAPPURTAR

Evalwazzjoni tad-Dejta

44. Ir-riżultati tal-opaċità, in-nefħa, u ż-żamma tal-fluworexxina fil-kornea għandhom jiġu evalwati b'mod separat sabiex tinħoloq klassi separata għal kull punt tat-tmiem. Il-klassijiet tal-ICE għal kull punt tat-tmiem imbagħad jiġu kkombinati biex tinħoloq Klassifikazzjoni tal-Irritanza għal kull sustanza tat-test.

Kriterji tad-Deċiżjoni

45. Ladarba kull punt tat-tmiem ikun ġie evalwat, il-klassijiet tal-ICE jistgħu jiġu assenjati abbażi ta' skala ta' valuri ddeterminata minn qabel. L-interpretazzjoni tal-ħxuna tal-kornea (it-Tabella 3), l-opaċità (it-Tabella 4), u ż-żamma tal-fluworexxina (it-Tabella 5) bl-użu ta' erba' klassijiet tal-ICE ssir skont l-iskali li ġejjin:

Tabella 3

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għall-ħxuna tal-kornea

Nefħa Medja tal-Kornea (%) (*)	Klassi tal-ICE
0 sa 5	I
> 5 sa 12	II
> 12 sa 18 (> 75 min wara t-trattament)	II
> 12 sa 18 (≤ 75 min wara t-trattament)	III
> 18 sa 26	III
> 26 sa 32 (> 75 min wara t-trattament)	III
> 26 sa 32 (≤ 75 min wara t-trattament)	IV
> 32	IV

(*) Punteġġi tan-nefħa fil-kornea jkunu applikabbli biss jekk il-ħxuna mkejla b'mikroskopju tal-kornea Haag-Streit BP900 b'apparat li jkejjel il-fond nru I u setting tal-wisa' tal-fetħa ta' 9½, ekwivalenti għal 0,095 mm. L-utenti għandhom ikunu konxji li l-mikroskopji tal-kornea jistgħu jagħtu kejl differenti ta' ħxuna tal-kornea jekk is-setting tal-wisa' tal-fetħa tkun differenti.

Tabella 4

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għall-opaċità

Medja tal-Punteġġ tal-Opaċità Massima (*)	Klassi tal-ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Ara t-Tabella 1.

▼**M2**

Tabella 5

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għaż-żamma medja tal-fluworexxina

Medja tal-Punteġġ taż-Żamma tal-Fluworexxina fit-30 minuta ta' wara t-trattament (*)	Klassi tal-ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Ara t-Tabella 2.

46. Il-klassifikazzjoni kumplessiva tal-irritanza *in vitro* għal sustanza tat-test tiġi vvalutata billi tinqara l-klassifikazzjoni ta' irritanza li tikkorrispondi għall-kombinazzjoni tal-kategoriji miksuba għan-nefħa fil-kornea, l-opaċità fil-kornea, u ż-żamma tal-fluworexxina u bl-applikazzjoni tal-iskema ppreżentata fit-Tabella 6.

Tabella 6

Klassifiki kumplessivi tal-irritanza *in vitro*

Klassifikazzjoni	Kombinazzjonijiet tat-tliet (3) Punti tat-Tmiem
Sustanza Korrużiva/Irritant Sever	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opaċità fil-kornea ≥ 3 fit-30 min (tal-anqas f'2 għajnejn) Opaċità fil-kornea = 4 fi kwalunkwe ħin (tal-anqas f'żewġ (2) għajnejn) Illaxkar sever tal-epitelju (tal-anqas f'għajn waħda (1)

(*) Kombinazzjonijiet li probabbilment ma jokkorrux.

47. Skont il-paragrafu 1, jekk is-sustanza tat-test ma tiġix identifikata bħala korrużiva għall-għajnejn jew irritant sever, għandu jitwettaq aktar ittestjar għall-finijiet ta' klassifikazzjoni u ttikkettar. Il-metodu ta' ttestjar ICE għandu akkuratezza kumplessiva ta' 83 % (120/144) sa 87 % (134/154), rata pożittiva falza ta' 6 % (7/122) sa 8 % (9/116), u rata negattiva falza ta' 41 % (13/32) sa 50 % (15/30) għall-identifikazzjoni ta' sustanzi korrużivi u irritanti severi għall-għajnejn, meta mqabbel mad-dejta, tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* li jsir fuq għajnejn il-fniek, ikklassifikata skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-EPA (1), l-UE (2), jew il-GHS (3). Meta sustanzi f'ċerti klassijiet kimiċi (*i.e.*, alkoħols u aġenti tensjoattivi) u fiżiċi (*i.e.*, solidi) ikunu esklużi mill-bażi tad-dejta, l-akkuratezza tal-ICE skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS tvarja minn 91 % (75/82) sa 92 % (69/75), ir-rati ta' pożittivi foloz ivarjaw minn 5 % (4/73) sa 6 % (4/70), u r-rati ta' negattivi foloz ivarjaw minn 29 % (2/7) sa 33 % (3/9) (4).

48. Anke jekk għas-sustanza tat-test ma tinkiseb l-ebda klassifikazzjoni ta' sustanza korrużiva jew irritant sever għall-għajnejn, id-dejta ICE tista' tkun utli, flimkien mad-dejta tat-test *in vivo* li jsir fuq għajnejn il-fniek jew minn test *in vitro* vvalidat kif xieraq, sabiex jiġu evalwati aktar il-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar ICE kif ukoll kemm dan huwa utli għall-identifikazzjoni ta' irritanti li mhumiex severi u sustanzi li mhumex irritanti (qed jiġi żviluppat Dokument ta' Gwida dwar l-użu ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* fuq l-għajnejn).

▼M2

Kriterji ta' Aċċettazzjoni ta' Studju

49. Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontrolli negattivi jew tal-midjum/solvent konkorrenti u l-kontrolli pożittivi konkorrenti jagħtu Klassifikazzjoni tal-Irritanza simili għal dik li tinsab fil-klassijiet ta' irritanti severi/sustanzi korrużivi, rispettivament.

Rapport tat-Test

50. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi t-tagħrif li ġej, jekk ikun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll

Isem/Ismijiet kimiku/kimiċi pereżempju l-isem strutturali użat mir-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi (CAS), u ismijiet oħra, jekk ikunu magħrufa;

In-Numru tar-Reġistru CAS (RN), jekk ikun magħruf;

Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew it-taħlita (f'perċentwal(i) skont il-piż), sakemm dan it-tagħrif ikun disponibbli;

Proprjetajiet fiżikokimiċi bħall-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, il-klassi kimika, is-solubilità fl-ilma rilevanti għat-twettiq tal-istudju;

It-trattament tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (*eż.*, it-tisħin, it-ħin);

L-istabilità, jekk tkun magħrufa;

Tagħrif dwar l-Isponser u l-Istallazzjoni tat-Test

L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-istallazzjoni tat-test u tad-direttur tal-istudju;

Identifikazzjoni tas-sors tal-għajnejn (*eż.*, l-istallazzjoni minn fejn inġabru);

Il-kundizzjonijiet tat-trasport u l-ħżin tal-għajnejn (*eż.*, id-data u l-ħin meta nġabru l-għajnejn, l-intervall tal-ħin qabel ma nbeda t-test);

Jekk disponibbli, karatteristiċi speċifiċi tal-annimali minn fejn inġabru l-għajnejn (*eż.*, età, sess, piż tal-annimal donatur);

Ġustifikazzjoni tal-Metodu ta' Ttestjar u tal-Protokoll Użati

Integrità tal-Metodu ta' Ttestjar

Il-proċedura użata sabiex tiġi żgurata l-integrità (*i.e.*, akkuratezza u affidabilità) tal-metodu ta' ttestjar tul iż-żmien (*eż.*, ittestjar perjodiku ta' sustanzi ta' profiċjenza, użu ta' dejta storika ta' kontrolli negattivi u pożittivi).

Kriterji għal Test Aċċettabbli

Jekk applikabbli, firxiet aċċettabbli ta' punti ta' riferiment ta' kontroll konkorrenti bbażati fuq dejta storika;

Kundizzjonijiet tat-Test

Deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata;

Mikroskopju tal-kornea użat (*eż.*, il-mudell);

Settings tal-istrument użati għall-mikroskopju tal-kornea;

Tagħrif dwar għajnejn it-tiġieġ użati, inklużi dikjarazzjonijiet rigward il-kwalità tagħhom;

▼M2

Dettalji tal-proċedura tat-test użata;

Konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test użata;

Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;

Referenza għad-dejta storika tal-mudell (*eż.*, kontrolli negattivi u pożittivi, sustanzi ta' profiċjenza, sustanzi ta' riferiment);

Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati;

Riżultati

Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati;

Jekk xieraq, ritratti tal-għajn;

Diskussjoni tar-Riżultati

Konklużjoni

LETTERATURA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.

(3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Disponibbli fuq:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponibbli fuq:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-Reġistrazzjoni, il-Valutazzjoni, l-Awtorizzazzjoni u r-Restrizzjoni ta' Sustanzi Kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni. ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Disponibbli fuq:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Disponibbli fuq:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/-prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibbli fuq:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Disponibbli fuq:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Din hija miżura tar-rendiment tal-metodu ta' ttestjar u aspett wieħed ta' "rilevanza." It-terminu spiss jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza", biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati pożittivi ta' metodu ta' ttestjar.

Sustanza ta' riferiment: Sustanza użata bħala standard għal paragun ma' sustanza tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-proprjetajiet li ġejjin; (i), sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii), xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii), karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv), dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa; u (v), potenza magħrufa fl-iskala tar-reazzjoni mixtieqa

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-għajn li tkopri l-ħabba tal-għajn u l-pupilla u tħalli d-dawl jgħaddi għal ġol-parti interna tal-għajn.

Opaċità tal-kornea: Kejl tal-estensjoni tal-opaċità tal-kornea wara esponiment għal sustanza tat-test. Żieda fl-opaċità tal-kornea hija indikattiva ta' ħsara fil-kornea.

Nefħa fil-kornea: Kejl oġġettiv fit-test tal-ICE tal-estensjoni tad-distensjoni tal-kornea wara esponiment għas-sustanza tat-test. Din tiġi espressa bħala perċentwal u kkalkulata mill-ewwel kejl (qabel l-iddożar) tal-ħxuna tal-kornea u l-ħxuna rreġistrata f'intervalli regolari wara esponiment għall-materjal tat-test, fit-test tal-ICE. Id-daqs tan-nefħa tal-kornea huwa indikattiv ta' ħsara fil-kornea.

Kategorija tal-EPA 1: Korrużiv (qerda irriversibbli tat-tessut tal-kornea) jew involviment tal-kornea jew irritazzjoni li tippersisti għal aktar minn 21 jum (1).

Kategorija tal-UE R41: Produzzjoni ta' ħsara fit-tessut tal-għajn, jew tħassir fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunx kompletament riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni (2).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' pożittivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wieħed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Żamma tal-fluworexxina: Kejl suġġettiv fit-test tal-ICE ta' kemm is-sodju tal-fluworexxina jinżamm miċ-ċelluli tal-epitelju fil-kornea wara l-esponiment għas-sustanza tat-test. L-ammont ta' fluworexxina li jinżamm huwa indikattiv tal-ħsara fl-epitelju tal-kornea.

GHS (Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-ħaddiema tal-emerġenza) u l-ambjent (3).

▼M2

Kategorija tal-GHS 1: Produzzjoni ta' ħsara fit-tessut tal-għajn, jew ħassir fiżiku serju tal-vista, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn, li ma jkunx kompletament riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni (3).

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandha l-potenzjal tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub) popolazzjoni jiġi/tiġi espost(a) għal dak l-aġent.

Kontroll negattiv: Replikazzjoni mhux trattata li fiha l-komponenti kollha tas-sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza tat-test u kampjuni ta' kontroll oħra sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Sustanzi li mhumiex irritanti: Sustanzi li mhumiex ikklassifikati bħala Kategorija I, II, jew III tal-EPA; Kategorija R41 jew R36 tal-UE; jew Kategorija tal-GHS 1, 2A, jew 2B irritanti tal-għajnejn (1)(2)(3).

Sustanza korrużiva għall-għajnejn: (a) Sustanza li tikkawża ħsara irriversibbli fl-għajnejn. (b) Sustanzi li huma kklassifikati bħala Kategorija 1 tal-GHS, Kategorija I tal-EPA, jew Kategorija R41 tal-UE irritanti għall-għajnejn (1) (2) (3).

Irritant għall-għajnejn: (a) Sustanza li tipproduċi bidla riversibbli fl-għajn wara li tiġi applikata fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn; (b) Sustanzi li mhumiex ikklassifikati bħala Kategorija II jew III tal-EPA; Kategorija tal-UE R36; jew Kategorija tal-GHS 2A, jew 2B irritanti tal-għajnejn (1)(2)(3).

Irritant sever għall-għajnejn: (a) Sustanza li tikkawża ħsara fit-tessut tal-għajn wara li tiġi applikata fuq is-superfiċje anterjuri tal-għajn u li ma tkunx riversibbli fi żmien 21 jum tal-applikazzjoni jew tikkawża ħassir fiżiku serju tal-vista. (b) Sustanzi li huma kklassifikati bħala Kategorija 1 tal-GHS, Kategorija I tal-EPA, jew Kategorija R41 tal-UE irritanti għall-għajnejn (1) (2) (3).

Kontroll pożittiv: Replikazzjoni li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża reazzjoni pożittiva. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-reazzjoni severa ma għandux ikun eċċessiv.

Affidabilità: Qies ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq skont l-istess protokoll. Tiġi vvalutatata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Mikroskopju tal-kornea (slit-lamp microscope): Strument li jintuża biex l-għajn tiġi eżaminata b'mod dirett taħt l-ingrandiment ta' mikroskopju binokulari billi joħloq immaġni dritta u stereoskopika. Fil-metodu ta' ttestjar ICE, dan l-istrument jntuża biex wieħed ikun jista' jara l-istrutturi anterjuri ta' għajn it-tiġieiġa kif ukoll biex ikejjel b'mod oġġettiv il-ħxuna tal-kornea b'apparat li jitwaħħal mal-istrument u li jkejjel il-fond.

Kontroll ta' solvent/midjum: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha tas-sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-midjum li jiġi pproċessat mas-sustanza tat-test trattata u kampjuni ta' kontroll oħra sabiex tiġi stabbilita l-ewwel reazzjoni għall-kampjuni trattati mis-sustanza tat-test maħlula fl-istess solvent jew midjum. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-midjum ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

▼M2

Ittestjar imtarraġ: Strateġija ta' ttestjar pass pass fejn it-tagħrif kollu dwar sustanza tat-test jiġi analizzat f'ordni speċifika, permezz ta' proċess fejn titqies l-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed tagħrif disponibbli għal deċiżjoni ta' klassifikazzjoni ta' periklu, qabel ma wieħed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża irritazzjoni jista' jiġi assenjat abbażi ta' tagħrif eżistenti, ma jkun meħtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal li sustanza tat-test tikkawża irritazzjoni ma jkunx jista' jiġi assenjat abbażi tat-tagħrif eżistenti proċedura ta' ttestjar sekwenzjali pass pass għandha titwettaq fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Metodu ta' ttestjar ivvalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-akkuratezza) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Huwa importanti li wieħed jinnota li metodu ta' ttestjar ivvalidat jista' jkun li ma jkollux rendiment tajjeb biżżejjed f'termini ta' akkuratezza u affidabilità sabiex jinstab aċċettabli għall-għan propost.

Importanza tal-evidenza: Il-proċess fejn jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' biċċiet ta' informazzjoni varji sabiex tintlaħaq u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza li tkun ta' periklu.

▼M2

Appendiċi 2

SUSTANZI KIMIĊI TA' PROFIĊJENZA GĦALL-METODU TA' TTESTJAR ICE

Qabel l-użu ta' rutina ta' metodu ta' ttestjar li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji jista' jkun li jkunu jixtiequ juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-korrużività għall-għajnejn ta' 10 sustanzi rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi ntgħażlu biex jirrappreżentaw l-iskala ta' reazzjonijiet ta' irritazzjoni/korrużjoni fl-għajn, li hija bbażata fuq ir-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (TG 405) (*i.e.*, il-Kategoriji 1, 2A, 2B, jew Mhux Ikklassifikata jew Ittikkettata skont il-GHS tan-NU) (3)(7). Madankollu, meta jitiqies kemm dawn l-assaġġi huma utli b'mod li huwa vvalidat (*i.e.*, biex jiġu identifikati sustanzi korrużivi/irritanti severi għall-għajnejn), hemm biss żewġ riżultati għall-finijiet ta' klassifikazzjoni (sustanza korrużiva/irritant sever jew sustanza mhux korrużiva/irritant mhux sever) biex tintwera l-profiċjenza. Kriterji oħra tal-għażla kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli b'mod kummerċjali, ikun hemm disponibbli dejta ta' referenzi ta' kwalità għolja *in vivo*, u li jkun hemm dejta ta' kwalità għolja miż-żewġ metodi *in vitro* li għalihom qegħdin jiġu żviluppati l-Linji Gwida għall-Ittestjar. Għal din ir-raġuni, sustanzi irritanti ntgħażlu mil-lista rrakkomandata mill-ICCVAM ta' 122 sustanza ta' referenza għall-validazzjoni ta' metodi ta' ttestjar ta' tossiċità għall-għajnejn *in vitro* (ara l-Appendiċi H, Lista ta' Sustanzi ta' Referenza Rrakkomandati mill-ICCVAM)(4). Id-dejta tar-referenzi hija disponibbli fid-Dokumenti ta' Analiżi tal-Isfond tal-ICCVAM għall-metodi ta' ttestjar tal-Opaċità u tal-Permeabilità tal-Kornea tal-Bovini (BCOP) u l-ICE (18) (19).

Tabella 1

Sustanzi rrakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika mal-ICE

Sustanza kimika	CASRN	Klassi Kimika (1)	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni *In Vivo* (2)	Klassifikazzjoni *In Vitro* (3)
Klorur tal-benżalkonju (5 %)	8001-54-5	Kompost ta' onju	Likwidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/ Irritant Sever
Kloressidin	55-56-1	Ammin, Ammidin	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/ Irritant Sever
Aċidu dibenżojl-L-tartariku	2743-38-6	Aċidu karbossiliku, Ester	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/ Irritant Sever
Imidażol	288-32-4	Eteroċikliku	Solidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/ Irritant Sever
Aċidu trikloroaċetiku (30 %)	76-03-9	Aċidu karbossiliku	Likwidu	Kategorija 1	Sustanza Korrużiva/ Irritant Sever
2,6-diklorobenż-ojl klorur	4659-45-4	Alid aċil	Likwidu	Kategorija 2A	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Etil-2-metilaċeto-aċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2B	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melħ inorganiku	Solidu	Kategorija 2A	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever

▼**M2**

Sustanza kimika	CASRN	Klassi Kimika ([1])	Forma Fiżika	Klassifikazzjoni *In Vivo* ([2])	Klassifikazzjoni *In Vitro* ([3])
Gliċerol	56-81-5	Alkoħol	Likwidu	Mhux tikkettat	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever
n-essan	110-54-3	Idrokarbonju (aċiliku)	Likwidu	Mhux tikkettat	Sustanza mhux korrużiva/Irritant mhux sever

Taqsiriet: CASRN = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

([1]) Klassijiet kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, abbażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-librerija nazzjonali tal-intestaturi tas-suġġetti mediċi tal-mediċina (MeSH) (disponibbli fuq http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU (3)(7).

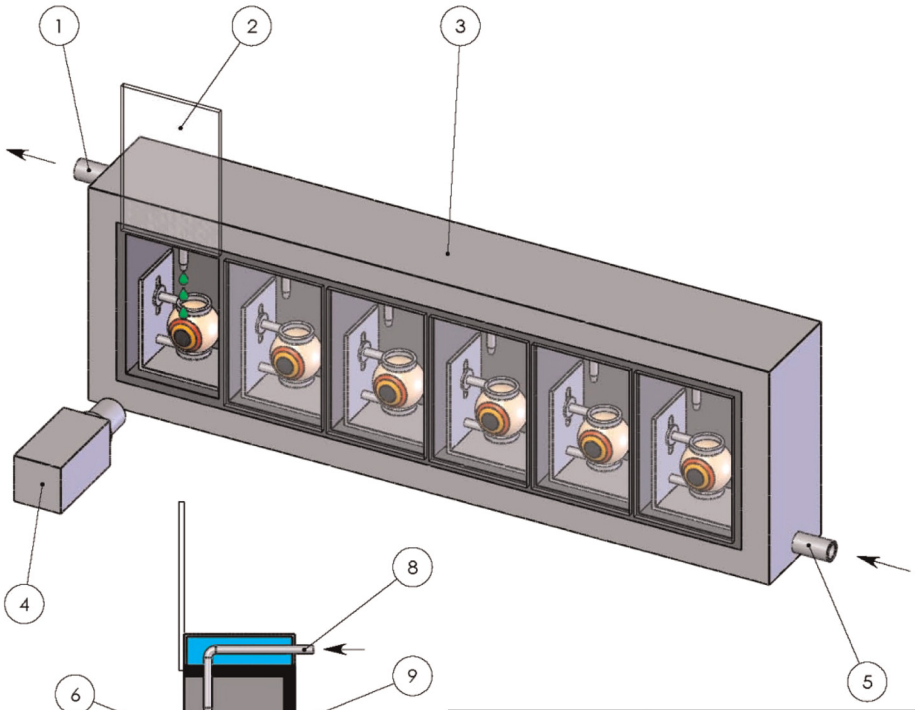
([3]) Abbażi tar-riżultati fil-BCOP u l-ICE.

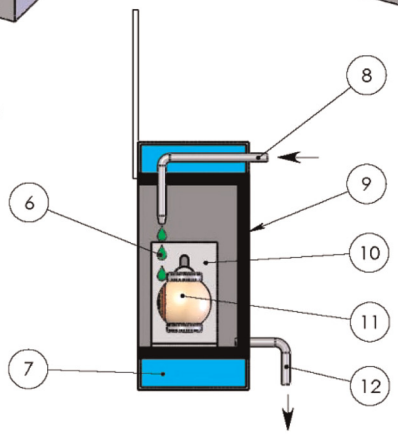
▼M2

Appendiċi 3

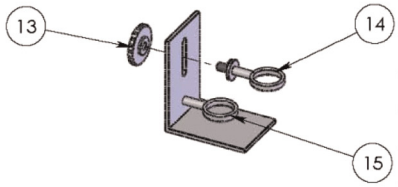
Dijagrammi tal-apparat tas-superfużjoni ICE u l-klampi tal-għajnejn

(Ara Burton et al. (17) għal deskrizzjonijiet ġeneriċi addizzjonali tal-apparat tas-superfużjoni u l-klampi tal-għajnejn)





KOMPARTIMENT F'TAQSIMA TRASVERSALI



APPARAT FEJN TITQIEGĦED L-GĦAJN

NRU TAL-OĠĠETT	DESKRIZZJONI
1	ŻBOKK GĦALL-ILMA SĦUN
2	BIEBA TIŻŻERŻAQ
3	APPARAT TAS-SUPERFUŻJONI
4	STRUMENT GĦAT-TKEJJIL OTTIKU
5	FTUĦ GĦAD-DĦUL TAL-ILMA SĦUN
6	SOLUZZJONI TA' ILMA BIL-MELĦ
7	ILMA SĦUN
8	FTUĦ GĦAD-DĦUL TAL-ILMA BIL-MELĦ
9	KOMPARTIMENT
10	APPARAT FEJN TITQIEGĦED L-GĦAJN
11	GĦAJN TA' TIĠIEĠA
12	ŻBOKK GĦALL-ILMA BIL-MELĦ
13	VIT LI JIFFISSA FIL-POST
14	ID TA' FUQ AĠĠUSTABBLI
15	ID TA' ISFEL FISSA

▼M3

B.49. **TEST TAL-MIKRONUKLEU TAĊ-ĊELLOLA MAMMIFERA *IN VITRO***

INTRODUZZJONI

1. L-analiżi tal-mikronukleu *in vitro* (MNvit) hija test ta' ġenotossiċità għall-individwazzjoni ta' mikronuklei (MN) fiċ-ċitoplażma ta' ċelloli fl-interfażi. Il-mikronuklei jistgħu joriġinaw minn frammenti ta' kromożomi aċentriċi (jiġifieri li ma għandhomx ċentromer), jew kromożomi sħaħ li ma jistgħux jemigraw lejn il-poli waqt l-istadju ta' anafaži tad-diviżjoni taċ-ċellola. L-analiżi tindividwa l-attività ta' sustanzi kimiċi klastoġeniċi u anewġeniċi (sustanzi u taħlitiet) (1) (2) f'ċelloli li għaddew mid-diviżjoni taċ-ċelloli wara l-esponiment għas-sustanza tat-test. Dan il-Metodu ta' Ttestjar (TM) jippermetti l-użu ta' protokolli bl-inibitur taċ-ċitokalażina B tal-polimerizzazzjoni tal-attina (actin polymerisation inhibitor cytochalasin B, cytoB) u mingħajr dan l-inibitur. Iż-żieda ta' cytoB qabel il-mitoži mmirata tippermetti l-identifikazzjoni u l-analiżi selettiva tal-frekwenza tal-mikronuklei f'ċelloli li temmew mitoži waħda peress li dawn iċ-ċelloli għandhom żewġ nuklei (3) (4). Dan it-TM jippermetti wkoll l-użu ta' protokolli mingħajr imblokkatur taċ-ċitokineżi, sakemm ikun hemm evidenza li l-popolazzjoni ta' ċelloli analizzati għaddiet minn mitoži.

2. Minbarra l-użu tal-analiżi tal-MNvit sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) li jinduċu l-mikronuklei, l-użu ta' imblokkatur taċ-ċitokineżi, it-tikkettar immunokimiku ta' kinetochores, jew l-ibridizzazzjoni b'sondi ċentromeriċi/telomeriċi (ibridizzazzjoni *in situ* ta' fluworexxenza (fluorescence *in situ* hybridisation — FISH)), ukoll jistgħu jipprovdu informazzjoni dwar il-mekkaniżmi ta' ħsara fil-kromożomi u tal-formazzjoni ta' mikronuklei (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Il-proċeduri ta' tikkettar u ibridizzazzjoni jistgħu jintużaw meta jkun hemm żieda fil-formazzjoni ta' mikronuklei u l-investigatur ikun jixtieq jiddetermina jekk iż-żieda kinitx ir-riżultat ta' avvenimenti klastoġeniċi u/jew anewġeniċi.

3. Il-mikronuklei jirrappreżentaw ħsara li ġiet trażmessa lil ċelloli ġġenerati (daughter cells), filwaqt li aberrazzjonijiet tal-kromożomi magħduda fiċ-ċelloli f'metafaži jistgħu ma jiġux trażmessi. Minħabba li l-mikronuklei fiċ-ċelloli fl-interfaži jistgħu jiġu evalwati b'mod relattivament oġġettiv, il-persunal tal-laboratorju jeħtieġ li jiddetermina biss jekk iċ-ċelloli ddividewx u kemm-il ċellola fiha mikronukleu. Għalhekk, il-preparazzjonijiet jistgħu jingħaddu relattivament malajr u l-analiżi tista' tiġi awtomatizzata. Dan jagħmilha prattika li eluf minflok mijiet ta' ċelloli jingħaddu f'kull trattament, biex b'hekk tiżdied il-qawwa tal-analiżi. Fl-aħħar nett, minħabba li l-mikronuklei jistgħu joħorġu minn kromożomi tardivi, hemm il-potenzjal li wieħed jindividwa sustanzi li jinduċu anewplojdi li huma diffiċli li wieħed jistudjahom f'testijiet konvenzjonali tal-aberrazzjoni tal-kromożomi, eż. Linja gwida tal-Ittestjar 473 tal-OECD (Kapitolu B.10 ta' dan l-Anness) (17). Madankollu, l-analiżi tal-MNvit ma tippermettix għad-divrenzjar ta' sustanzi kimiċi li jinduċu poliplojdi minn dawk li jinduċu klastoġeniċità mingħajr tekniki speċjali bħall-FISH deskritta fil-paragrafu 2.

4. L-analiżi tal-MNvit hija metodu *in vitro* li tipikament tuża ċelloli tal-bniedem jew tal-annimali gerriema kkultivati. Hija tipprovdi bażi komprensiva għall-investigazzjoni tal-potenzjal ta' ħsara tal-kromożomi *in vitro* minħabba li jistgħu jiġu individwati kemm l-anewġeni kif ukoll il-klastoġeni.

5. L-analiżi tal-MNvit hija b'saħħitha u effettiva f'varjetà ta' tipi ta' ċelloli, u fil-preżenza jew fin-nuqqas ta' cytoB. Hemm dejta estensiva li tappoġġa l-validità tal-analiżi tal-MNvit permezz ta' diversi linji ta' ċelloli tal-annimali gerriema (CHO, V79, CHL/IU, u L5178Y) u limfoċiti tal-bniedem (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Dawn jinkludu, b'mod partikolari, l-istudji ta' validazzjoni internazzjonali kkoordinati mis-Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) u r-rapporti tal-Grupp ta' Ħidma Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossiċità (4) (16). Id-dejta disponibbli ġiet evalwata mill-ġdid fi studju ta' validazzjoni retrospettiv

▼M3

skont il-piż tal-evidenza miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) tal-Kummissjoni Ewropea, u l-metodu tat-test ġie approvat bħala xjentifikament validu mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC) (32) (33) (34). Ġie deskritt l-użu tal-linja ta' ċelloli tal-bniedem limfoblastojdi TK6 (35), ċelloli HepG2 (36) (37) u ċelloli primarji tal-Embriju tal-Ħemster Sirjan (38), għalkemm ma ntużawx fi studji ta' validazzjoni.

DEFINIZZJONIJIET

6. Definizzjonijiet użati huma pprovduti f'Appendiċi 1.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

7. It-testijiet li jsiru *in vitro* ġeneralment ikunu jeħtieġu l-użu ta' sors eżoġenu ta' attivazzjoni metabolika diment li ċ-ċelloli ma jkunux metabolikament kompetenti fir-rigward tas-sustanzi li jkunu qegħdin jiġu ttestjati. Is-sistema eżoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għal kollox il-kundizzjonijiet *in vivo*. Għandha tingħata attenzjoni wkoll sabiex jiġu evitati kundizzjonijiet li jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali li ma jirriflettux mutaġeniċità intrinsika, u li jistgħu joħorġu minn fatturi bħal bidliet ċari fil-pH jew osmolalità, jew permezz ta' livelli għoljin ta' ċitotossiċità (39) (40) (41). Jekk is-sustanza sustanza kimika tat-test toħloq bidla fil-pH tal-mezz fil-ħin taż-żieda, il-pH għandu jiġi aġġustat, preferibbilment permezz tal-ibbaffjar tas-soluzzjoni tal-istokk sabiex il-volumi kollha tal-konċentrazzjonijiet kollha tat-test, u għall-kontrolli kollha, jibqgħu l-istess.

8. Biex wieħed janalizza l-induzzjoni tal-mikronuklei, huwa essenzjali li l-mitożi tkun seħħet kemm fil-kultivazzjonijiet ittrattati kif ukoll f'dawk mhux ittrattati. L-iktar stadju informattiv għall-għadd tal-mikronuklei huwa f'ċelloli li temmew mitożi waħda waqt jew wara t-trattament bis-sustanza tat-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

9. Il-kultivazzjonijiet taċ-ċelloli ta' oriġini mill-bniedem jew mill-mammiferi huma esposti għas-sustanza tat-test kemm b'sors eżoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr dan is-sors diment li ma jintużawx ċelloli b'kapaċità metabolizzanti adegwata. Sustanzi kimiċi simultanji ta' solvent/mezz (VC) u ta' kontroll pożittiv (PC) huma inklużi fit-testijiet kollha.

10. Waqt jew wara l-esponiment għas-sustanza tat-test, iċ-ċelloli jitkabbru għal perjodu suffiċjenti sabiex il-ħsara fil-kromożomi jew fil-magħżel twassal għall-formazzjoni tal-mikronuklei f'ċelloli fl-interfaża. Għall-induzzjoni tal-anewplojdi, is-sustanza tat-test għandha normalment tkun preżenti waqt il-mitożi. Ċelloli fl-interfaża miġbura u mlewna jiġu analizzati għall-preżenza ta' mikronuklei. Idealment, il-mikronuklei għandhom jingħaddu biss f'dawk iċ-ċelloli li jkunu temmew il-mitożi waqt l-esponiment għas-sustanza tat-test jew waqt il-perjodu ta' wara l-esponiment, jekk jintuża wieħed. F'kultivazzjonijiet li ġew ittrattati b'imblokkatur taċ-ċitokineżi, dan jinkiseb billi jingħaddu biss iċ-ċelloli b'żewġ nuklei. Fin-nuqqas ta' imblokkatur taċ-ċitokineżi, huwa importanti li jintwera li ċ-ċelloli analizzati aktarx li għaddew mid-diviżjoni taċ-ċelloli waqt jew wara l-esponiment għas-sustanza tat-test. Għall-protokolli kollha, huwa importanti li jintwera li l-proliferazzjoni taċ-ċelloli seħħet kemm fil-kultivazzjonijiet ta' kontroll kif ukoll f'dawk ittrattati, u l-grad ta' ċitotossiċità jew ċitostażi kkawżata mis-sustanza tat-test għandu jiġi vvalutat fil-kultivazzjonijiet (jew f'kultivazzjonijiet paralleli) li jingħaddu għall-mikronuklei.

▼M3

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Preparazzjonijiet

11. Jistgħu jintużaw limfoċiti primarji kkultivati periferiċi tad-demm tal-bniedem (5) (19) (42) (43) u għadd ta' linji ta' ċelloli tal-annimali gerriema bħal CHO, V79, CHL/IU, u ċelloli L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). L-użu ta' linji u tipi oħrajn ta' ċelloli għandu jkun iġġustifikat abbażi tal-prestazzjoni tagħhom murija fl-analiżi, kif deskritt fit-taqsima dwar il-Kriterji ta' Aċċettazzjoni. Minħabba li l-frekwenza tal-isfond tal-mikronuklei tinfluwenza s-sensittività tal-analiżi, huwa rrakkomandat li jintużaw tipi ta' ċelloli bi frekwenza ta' sfond baxxa u stabbli ta' formazzjoni ta' mikronuklei.

12. Il-limfoċiti periferiċi tad-demm tal-bniedem għandhom jinkisbu minn individwi żgħażagħ (ta' madwar 18-35 sena), b'saħħithom, ma jpejpux u li huma magħrufa li reċentement ma kinux esposti għal sustanzi kimiċi ġenotossiċi jew għar-radjazzjoni. Jekk jinġabru ċelloli għall-użu mingħand aktar minn donatur wieħed, l-għadd ta' donaturi għandu jkun speċifikat. Il-frekwenza tal-mikronuklei tiżdied mal-età u din it-tendenza hija aktar ċara fin-nisa milli fl-irġiel (44) u dan għandu jiġi kkunsidrat fl-għażla ta' ċelloli għall-ġbir minn donaturi.

Il-kundizzjonijiet tal-mezzi u tal-kultivazzjoni

13. Kundizzjonijiet xierqa tal-mezz ta' kultivazzjoni u tal-inkubazzjoni (konteniturі ta' kultivazzjoni, konċentrazzjoni ta' CO_2, temperatura, u umdità) għandhom jintużaw għaż-żamma tal-kultivazzjonijiet. Linji u razez ta' ċelloli stabbiliti għandhom jiġu ċċekkjati regolarment għall-istabilità tal-għadd ta' kromożomi modali u n-nuqqas ta' kontaminazzjoni ta' majkoplażma, u ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kkontaminati jew jekk l-għadd ta' kromożomi modali jkun inbidel. Il-ħin normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli għall-kundizzjonijiet ta' kultivazzjoni użati fil-laboratorju tal-ittestjar għandu jkun magħruf. Jekk jintuża l-metodu ta' imblukkar taċ-ċitokineżi allura l-konċentrazzjoni tal-inibitur taċ-ċitokineżi għandha tkun ottimizzata għat-tip partikolari taċ-ċellola u għandha tintwera li tipproduċi rendiment tajjeb ta' ċelloli b'żewġ nuklei għall-għadd.

Preparazzjoni tal-kultivazzjonijiet

14. Linji u razez ta' ċelloli stabbiliti: iċ-ċelloli jitnisslu minn kultivazzjonijiet stokkjati, imqiegħda fil-mezz ta' kultivazzjoni f'densità tali li l-kultivazzjonijiet ma jilħquxx konfluwenza f'saffi uniċi, u l-kultivazzjonijiet ta' sospensjoni ma jilħquxx densità eċċessiva qabel ma jinġabru, u jiġu inkubati f'temperatura ta' 37 °C.

15. Limfoċiti: demm sħiħ ittrattat b'antikoagulanti (eż. eparina), jew limfoċiti separati, huma kkultivati fil-preżenza ta' mitoġenu eż. fitoemagglutinina (PHA) qabel l-esponiment għas-sustanza tat-test u cytoB.

Attivazzjoni metabolika

16. Għandhom jintużaw sistemi eżoġeni ta' metabolizzazzjoni meta jintużaw ċelloli b'kapaċità metabolika endoġena inadegwata. Is-sistema li tintuża l-aktar hija frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata b'kofattur (S9) imħejjija mill-fwied ta' annimali gerriema ttrattati b'sustanzi li jinduċu l-enzimi bħall-Aroclor 1254 (45) (46) jew kombinazzjoni ta' fenobarbiton u β-naftoflavon (46) (47) (48) (49). Din il-kombinazzjoni ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar il-Pollutanti Organiċi Persistenti (50) u r-Regolament (KE) Nru 850/2004 dwar il-Pollutanti Organiċi Persistenti (66) u ntweriet li hija daqstant effettiva daqs l-Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidaži b'funzjoni mħallta (46) (47) (48) (49). Il-frazzjoni S9 tintuża normalment f'konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1-10 % (v/v) fil-mezz tat-test finali. Il-kundizzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika tista' tiddependi mill-klassi ta' sustanza kimika li qiegħda tiġi ttestjata u f'ċerti każijiet jista' jkun xieraq li wieħed juża aktar minn konċentrazzjoni waħda ta' S9.

▼**M3**

17. Linji ta' ċelloli mfassla ġenetikament li jesprimu enzimi attivanti speċifiċi tal-bniedem jew tal-annimali gerriema jistgħu jeliminaw il-ħtieġa ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena, u jistgħu jintużaw bħala ċ-ċelloli tat-test. F'dawn il-każijiet l-għażla tal-linji taċ-ċelloli użati għandha tkun iġġustifikata xjentifikament, eż. skont ir-rilevanza tal-ossidaži b'funzjoni mħallta għall-metaboliżmu tas-sustanza tat-test (51), u r-reazzjoni tagħhom għal klastoġeni u anewġeni magħrufa (ara t-taqsima separata dwar il-Kriterji ta' Aċċettabbiltà). Għandu jkun rikonoxxut li s-sustanza li qiegħda tiġi ttestjata tista' ma tkunx metabolizzata mill-ossidaži b'funzjoni mħallta espressa; f'dan il-każ, ir-riżultati negattivi ma jindikawx li s-sustanza tat-test ma tistax tinduċi mikronuklei.

Preparazzjoni tas-sustanza tat-test

18. Sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu f'solventi jew mezzi xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli. Sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiżdiedu direttament fis-sistemi tat-test u/jew dilwiti qabel it-trattament. Gassijiet jew sustanzi kimiċi volatili għandhom jiġu ttestjati permezz ta' modifikazzjonijiet xierqa għall-protokolli standard, bħat-trattament f'kontenituri ssiġillati (52) (53). Għandhom jintużaw preparazzjonijiet friski tas-sustanza tat-test sakemm dejta ta' stabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Kundizzjonijiet tat-test

Solventi/mezzi

19. Is-solvent/mezz ma għandux jirreaġixxi mas-sustanza tat-test, jew ikun inkompatibbli mas-sopravivenza taċ-ċelloli jew maż-żamma tal-attività tal-S9 fil-konċentrazzjoni użata. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħrajn minflok dawk stabbiliti sew (eż. ilma, mezz ta' kultivazzjoni taċ-ċelloli, sulfossidu tad-dimetil), l-użu tagħhom għandu jkun appoġġat minn dejta li tindika l-kompatibbiltà tagħhom mas-sustanza tat-test u n-nuqqas ta' tossiċità ġenetika tagħhom. Huwa rrakkomandat li, kull fejn ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz likwidu.

L-użu ta' cytoB bħala imblokkatur taċ-ċitokineži

20. Waħda mill-aktar konsiderazzjonijiet importanti fil-prestazzjoni tal-analiži tal-MNvit hija l-iżgurar li ċ-ċelloli magħduda temmew il-mitoži waqt it-trattament jew il-perjodu ta' inkubazzjoni wara t-trattament, jekk jintuża wieħed. CytoB hija s-sustanza li ntużat l-aktar sabiex timblokka ċ-ċitokineži minħabba li tinibixxi l-ġbir tal-attina, u b'hekk tipprevjeni s-separazzjoni taċ-ċelloli ġġenerati (daughter cells) wara l-mitoži, li twassal għall-formazzjoni ta' ċelloli b'żewġ nuklei (5) (54) (55). L-għadd tal-mikronuklei, għalhekk, jista' jkun illimitat għal ċelloli li għaddew minn mitoži waqt jew wara t-trattament. L-effett tas-sustanza tat-test fuq il-kinetika tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jista' jitkejjel fl-istess ħin. Is-cytoB għandu jintuża bħala imblokkatur taċ-ċitokineži meta l-limfoċiti tal-bniedem jintużaw minħabba li l-ħinijiet taċ-ċikli taċ-ċelloli jkunu varjabbli f'kultivazzjonijiet u fost id-donaturi u minħabba li mhux il-limfoċiti kollha jirreaġixxu għall-PHA. Intużaw metodi oħrajn fl-ittestjar ta' linji ta' ċelloli sabiex jiġi stabbilit jekk iċ-ċelloli magħduda nqasmux; dawn huma indirizzati hawn taħt (ara l-paragrafu 26).

21. Il-konċentrazzjoni xierqa ta' cytoB għandha tkun stabbilita mil-laboratorju għal kull tip ta' ċellola sabiex tinkiseb il-frekwenza ottimali ta' ċelloli b'żewġ nuklei fil-kultivazzjonijiet ta' kontroll fis-solvent/mezz. Il-konċentrazzjoni xierqa ta' cytoB normalment tkun bejn 3 u 6 μg/ml.

▼M3

Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli u ċ-ċitotossiċità u l-għażla tal-konċentrazzjonijiet ta' esponiment

22. Meta wieħed jiddetermina l-ogħla konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li għandha tkun ittestjata, il-konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva, il-preċipitazzjoni fil-mezz tal-kultivazzjoni, u bidliet ċari fil-pH jew osmolalità (39) (40) (41), għandhom jiġu evitati.

23. Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jsir sabiex ikun żgurat li ċ-ċelloli ttrattati jkunu għaddew minn mitożi waqt l-analiżi u li t-trattamenti jsiru fil-livelli xierqa ta' ċitotossiċità (ara l-Paragrafu 29). Iċ-ċitotossiċità għandha tkun stabbilita b'attivazzjoni metabolika jew mingħajrha f'ċelloli li jeħtieġu attivazzjoni metabolika permezz taż-żieda relattiva fl-għadd taċ-ċelloli (RICC) jew irduppjar relattiv tal-popolazzjoni (RPD) (ara l-Appendiċi 2 għall-formoli) sakemm ma tintużax is-cytoB. Meta tintuża s-cytoB, iċ-ċitotossiċità tista' tkun stabbilita permezz tal-indiċi ta' replikazzjoni (RI) (ara Appendiċi 2 għall-formola).

24. It-trattament tal-kultivazzjonijiet b'cytoB, u l-kejl tal-frekwenzi relattivi ta' ċelloli b'nukleu wieħed, żewġ nuklei jew diversi nuklei fil-kultivazzjoni, jipprovdi metodu eżatt tal-kwantifikazzjoni tal-effett fuq il-proliferazzjoni taċ-ċelloli u l-attività ċitotossika jew ċitostatika ta' trattament (5), u jiżgura li ċelloli li nqasmu waqt jew wara t-trattament biss jiġu magħduda.

25. Fi studji b'cytoB, iċ-ċitostaži/ċitotossiċità tista' tiġi kkwantifikata mill-indiċi ta' proliferazzjoni tal-imblokkatur taċ-ċitokineži (CBPI) (5) (26) (56) jew tista' tinħareġ mill-RI minn mill-inqas 500 ċellola għal kull kultivazzjoni (ara Appendiċi 2 għall-formuli). Meta s-cytoB jintuża għall-valutazzjoni tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli, CBPI jew RI għandhom jiġu stabbiliti minn mill-inqas 500 ċellola għal kull kultivazzjoni. Dan il-kejl fost oħrajn jista' jintuża sabiex tiġi stmata ċ-ċitotossiċità billi jitqabblu l-valuri fil-kultivazzjonijiet ittrattati u ta' kontroll. Il-valutazzjoni ta' indikaturi oħrajn ta' ċitotossiċità (eż. konfluwenza, għadd ta' ċelloli, apoptoži, nekroži, għadd ta' metafaži) tista' tipprovdi informazzjoni utli.

26. Fi studji mingħajr cytoB, jeħtieġ li jintwera li ċ-ċelloli magħduda fil-kultivazzjoni inqasmu waqt jew wara t-trattament bis-sustanza tat-test, inkella jistgħu jiġu prodotti reazzjonijiet negattivi foloz. Metodi li ntużaw sabiex ikun żgurat li ċ-ċelloli maqsuma qegħdin jingħaddu jinkludu l-inkorporazzjoni u l-individwazzjoni sussegwenti tal-bromodeossiuridina (BrdU) għall-identifikazzjoni ta' ċelloli li rreplikaw (57), il-formazzjoni ta' kloni meta ċ-ċelloli minn linji ta' ċelloli permanenti jiġu ttrattati u magħduda *in situ* fuq slajd tal-mikroskopju (Indiċi ta' Proliferazzjoni (PI)) (25) (26) (27) (28), jew il-kejl ta' Rduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD) jew Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC) jew metodi oħrajn ippruvati (16) (56) (58) (59) (ara Appendiċi 2 għall-formoli). Il-valutazzjoni ta' indikaturi oħrajn għaċ-ċitotossiċità jew ċitostaži (eż. konfluwenza, għadd ta' ċelloli, apoptoži, nekroži, għadd ta' metafaži) tista' tipprovdi informazzjoni utli.

27. Għallinqas għandhom jiġu evalwati tliet konċentrazzjonijiet ta' test analizzabbli. Sabiex jinkiseb dan, jista' jkun meħtieġ li jsir l-esperiment permezz ta' għadd akbar ta' konċentrazzjonijiet spazjati viċin xulxin u li tiġi analizzata l-formulazzjoni ta' mikronuklei f'dawk il-konċentrazzjonijiet li jipprovdu l-firxa xierqa ta' ċitotossiċitajiet. Strateġija alternattiva hija li jsir test preliminari ta' ċitotossiċità sabiex tonqos il-firxa għat-test definittiv.

28. L-ogħla konċentrazzjoni għandha timmira li tipproduċi 55 ± 5 % ċitotossiċità. Livelli ogħla jistgħu jinduċu ħsara fil-kromożomi bħala effett sekondarju ta' ċitotossiċità (60). Meta sseħħ ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżula għandhom ikopru firxa minn dik li tipproduċi 55 ± 5 % ċitotossiċità, sa ftit li xejn jew l-ebda ċitotossiċità.

▼M3

29. Jekk ma tkun osservata l-ebda ċitotossiċità jew preċipitat, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tikkorrispondi għal 0,01 M, 5 mg/mL jew 5 µl/mL, skont liema hija l-aktar baxxa. Il-konċentrazzjonijiet magħżula għall-analiżi għandhom, ġeneralment, ikunu separati minn spazju ta' mhux aktar minn 10. Għal sustanzi tat-test li juru kurva ta' konċentrazzjoni-reazzjoni wieqfa, jista' jkun meħtieġ li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test jiġu spazjati aktar viċin xulxin sabiex il-kultivazzjonijiet fil-firxiet moderati u baxxi tat-tossiċità jkunu magħduda wkoll.

30. Meta s-solubbiltà tkun fattur li jillimita, il-konċentrazzjoni massima, jekk ma tkunx limitata biċ-ċitotossiċità, għandha tkun il-konċentrazzjoni l-aktar baxxa li fiha l-preċipitat minimu jkun viżibbli fil-kultivazzjonijiet, sakemm ma jkunx hemm interferenza bl-għadd. L-evalwazzjoni tal-preċipitazzjoni għandha ssir permezz ta' metodi bħal mikroskopija ħafifa, l-innutar ta' preċipitat li jippersisti, jew li jidher waqt il-kultivazzjoni (sal-aħħar tat-trattament).

Kontrolli

31. Kontrolli simultanji pożittivi u b'solvent/mezz kemm b'attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha għandhom ikunu inklużi f'kull esperiment.

32. PC huma meħtieġa sabiex juru l-abbiltà taċ-ċelloli użati, u l-protokoll tat-test, li jiġu identifikati l-klastoġeni u l-anewġeni, u sabiex tkun affermata l-kapaċità metabolika tal-preparazzjoni S9. Il-PC għandu juża indutturi magħrufa ta' formazzjoni ta' mikronuklei f'konċentrazzjonijiet mistennija li jagħtu żidiet żgħar iżda riproduċibbli fuq l-isfond, u li juru s-sensittività tas-sistema ta' ttestjar. Il-konċentrazzjonijiet tal-PC għandhom jintgħażlu b'mod li l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx minnufih lill-qarrej l-identità tal-islajds ikkodifikati.

33. Klastoġenu li jeħtieġ attivazzjoni metabolika (eż. ċiklofosfammid; benżo[a]piren) għandu jintuża sabiex juri kemm il-kompetenza metabolika kif ukoll l-abbiltà tas-sistema tal-ittestjar li tindividwa l-klastoġeni. PC oħrajn jistgħu jintużaw jekk ikunu ġġustifikati. Minħabba li ċerti PC li jeħtieġu attivazzjoni metabolika jistgħu jkunu attivi mingħajr attivazzjoni metabolika eżoġena taħt ċerti kundizzjonijiet ta' trattament jew f'ċerti linji ta' ċelloli, il-ħtieġa għal attivazzjoni metabolika, u l-attività tal-preparazzjoni S9, għandha tkun ittestjata fil-linja ta' ċelloli magħżula u fil-konċentrazzjonijiet magħżula.

34. Fil-preżent, l-ebda anewġen ma huwa magħruf li jeħtieġ attivazzjoni metabolika għall-attività ġenotossika tiegħu (16). PC aċċettati bħalissa għall-attività anewġenika huma, pereżempju, kolkiċina u vinblastina. Sustanzi kimiċi oħrajn jistgħu jintużaw jekk jinduċu mikronuklei biss, jew primarjament, permezz ta' attività anewġenika. Sabiex tiġi evitata l-ħtieġa għal żewġ PC (għall-klastoġeniċità u l-anewġeniċità) mingħajr attivazzjoni metabolika, il-kontroll tal-anewġeniċità jista' jservi bħala l-PC mingħajr S9, u l-kontroll tal-klastoġeniċità jista' jintuża għall-ittestjar tal-adegwatezza tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika użata. PC kemm għall-klastoġeniċità u l-anewġeniċità għandu jintuża fiċ-ċelloli li ma jeħtiġux S9. Il-PC issuġġeriti huma inklużi fl-Appendiċi 3.

35. L-użu ta' PC relatati mal-klassi tas-sustanzi kimiċi jista' jiġi kkunsidrat, meta jkunu disponibbli sustanzi kimiċi adattati. Il-PC kollha użati għandhom ikunu xierqa għat-tip ta' ċellola u l-kundizzjonijiet ta' attivazzjoni.

▼M3

36. Kontrolli ta’ solvent/mezz għandhom ikunu inklużi għal kull ħin ta’ ġbir. Barra minn hekk, NC mhux ittrattati (neqsin minn solvent/mezz) għandhom jintużaw ukoll diment li ma jkunx hemm dejta ta’ kontroll storika ppubblikata jew tal-laboratorju li turi li l-ebda effett ġenotossiku jew effett dannuż ieħor ma jiġi kkawżat mis-solvent magħżul fil-konċentrazzjonijiet użati.

PROĊEDURA TAT-TEST

Skeda tat-Trattament

37. Sabiex tkun massimizzata l-probabbiltà tal-identifikazzjoni ta’ anewġenu jew klastoġenu li jaġixxu fi stadju speċifiku fiċ-ċiklu taċ-ċelloli, huwa importanti li għadd suffiċjenti ta’ ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test matul l-istadji kollha taċ-ċikli taċ-ċelloli tagħhom. Għalhekk, l-iskeda tat-trattament għal-linji taċ-ċelloli u l-kulturi taċ-ċelloli primarji jistgħu jvarjaw kemmxejn minn dawk għal-limfoċiti, li jitolbu li l-istimulazzjoni mitoġenika tibda ċ-ċiklu taċ-ċelloli tagħhom, u dawn huma kkunsidrati fil-Paragrafi 41–43 (16).

38. Il-konsiderazzjonijiet teoretiċi, flimkien mal-informazzjoni ppubblikata (18) jindikaw li l-maġġoranza tal-anewġeni u l-klastoġeni ser jiġu identifikati f'perjodu ta’ trattament għal żmien qasir ta’ 3 sa 6 sigħat fil-preżenza u fin-nuqqas ta’ S9, segwiti mit-tneħħija tas-sustanza tat-test u perjodu ta’ tkabbir ta’ 1,5–2,0 ċikli ta’ ċelloli (6). Għandhom jittieħdu kampjuni taċ-ċelloli fi żmien ekwivalenti għal madwar 1,5–2,0 darba aktar mit-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli (*i.e.* mhux ittrattati) wara l-bidu jew wara t-tmiem tat-trattament (Ara t-Tabella 1). Il-perjodi tat-teħid tal-kampjuni jew tal-irkupru jistgħu jiġu estiżi jekk ikun magħruf jew suspettat li s-sustanza tat-test taffettwa l-perjodu ċikliku taċ-ċelloli (*pereżempju* meta jiġu ttestjati l-analogi nukleożidi).

39. Minħabba ċ-ċitotossiċità potenzjali tal-preparazzjonijiet tal-S9 għaċ-ċelloli mammiferi kkultivati, trattament ta’ esponiment estiż ta’ 1,5–2,0 ċikli ta’ ċelloli normali jintuża biss fin-nuqqas ta’ S9. Fit-trattament estiż, jiġu offruti għażliet biex jippermettu t-trattament taċ-ċelloli bis-sustanza kimika tat-test fin-nuqqas jew fil-preżenza ta’ cytoB. Dawn l-għażliet jindirizzaw is-sitwazzjonijiet li jista' jkun hemm tħassib dwarhom fir-rigward tal-interazzjonijiet possibbli bejn is-sustanza tat-test u s-cytoB.

40. L-iskedi ssuġġeriti għat-trattament taċ-ċelloli huma ppreżentati fit-Tabella 1. Dawn l-iskedi ta’ trattament ġenerali jistgħu jiġu mmodifikati skont l-istabilità jew ir-reattività tas-sustanza tat-test jew il-karatteristiċi ta’ tkabbir partikolari taċ-ċelloli li jkunu qegħdin jintużaw. It-trattamenti kollha għandhom jibdew u jintemmu waqt li ċ-ċelloli jkunu qegħdin jikbru b'mod esponenzjali. Dawn l-iskedi huma ppreżentati f'aktar dettall fil-paragrafi 41–47 li ġejjin.

Tabella 1

It-trattament taċ-ċelloli u l-perjodi tal-ħsad għall-analiżi tal-Mnvit

Limfoċiti, ċelloli primarji u linji ta’ ċelloli ttrattati b'cytoB	+ S9	Trattament għal 3–6 sigħat fil-preżenza ta’ S9; tneħħija tal-S9 u l-mezz tat-trattament; żieda ta’ mezz frisk u cytoB; ħsad ta’ 1,5–2,0 ċikli ta’ ċelloli normali aktar tard.
	– S9 Esponiment qasir	Trattament għal 3–6 sigħat; tneħħija tal-mezz tat-trattament; żieda ta’ mezz frisk u cytoB; ħsad ta’ 1,5–2,0 ċikli ta’ ċelloli normali aktar tard.

▼M3

	– S9 Esponiment estiż	*Għażla A:* Trattament għal 1,5–2,0 ċikli ta' ċelloli normali fil-preżenza tas-cytoB; ħsad fi tmiem il-perjodu tal-esponiment. *Għażla B:* Trattament għal 1,5–2,0 ċikli ta' ċelloli normali; tneħħija tas-sustanza tat-test; żieda ta' mezz frisk u cytoB; ħsad ta' 1,5–2,0 ċikli ta' ċelloli normali aktar tard.
Linji ta' ċelloli ttrattati mingħajr cytoB (Identiċi għall-iskedi tat-trattament deskritti hawn fuq bl-eċċezzjoni li ma tiżdied ebda cytoB)		

Limfoċiti, ċelloli primarji u linji ta' ċelloli b'cytoB

41. Għal-limfoċiti, l-aktar approċċ effiċjenti huwa li l-esponiment għas-sustanza tat-test jinbeda f'44-48 siegħa wara l-istimulazzjoni tal-PHA, meta tkun telqet is-sinkronizzazzjoni taċ-ċiklu (5). Fl-analiżi inizjali, iċ-ċelloli jiġu ttrattati għal 3 sa 6 sigħat bis-sustanza tat-test fin-nuqqas jew fil-preżenza ta' S9. Il-mezz tat-trattament jitneħħa u jiġi sostitwit b'mezz frisk li jkun fih is-cytoB, u ċ-ċelloli jittieħdu wara 1,5–2,0 ċikli taċ-ċelloli normali.

42. Jekk iż-żewġ testijiet inizjali tat-trattament qasir (3–6 sigħat) ikunu negattivi jew ekwivoċi, għandu jintuża trattament ta' esponiment estiż sussegwenti mingħajr S9. Hemm żewġ għażliet ta' trattament li huma disponibbli u ugwalment aċċettabbli. Madankollu, jista' jkun aktar xieraq li tiġi segwita l-Għażla A għal limfoċiti stimulati fejn it-tkabbir esponenzjali jista' jkun qiegħed jonqos f'96 siegħa wara l-istimulazzjoni. Barra minn hekk, il-kulturi taċ-ċelloli ma għandhomx ikunu laħqu konfluwenza sal-perjodu finali tat-teħid tal-kampjuni fl-Għażla B.

— Għażla A: Iċ-ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test għal 1,5–2,0 ċikli taċ-ċelloli normali, u jittieħdu fl-aħħar tal-perjodu tat-trattament,

— Għażla B: Iċ-ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test għal 1,5–2,0 ċikli taċ-ċelloli normali. Il-mezz tat-trattament jitneħħa u jiġi sostitwit b'mezz frisk, u ċ-ċelloli jittieħdu wara 1,5–2,0 ċikli taċ-ċelloli normali addizzjonali.

43. Iċ-ċelloli primarji u l-linji taċ-ċelloli għandhom jiġu ttrattati b'mod simili għal-limfoċiti, ħlief li mhuwiex neċessarju li dawn jiġu stimulati b'PHA għal 44–48 siegħa. Ċelloli oħrajn minbarra l-limfoċiti għandhom ikunu esposti b'tali mod li fiż-żmien tat-terminazzjoni tal-istudju, iċ-ċelloli jkunu għadhom fil-fażi msejħa "log-phase growth".

Linji ta' ċelloli mingħajr cytoB

44. Iċ-ċelloli għandhom jiġu ttrattati għal 3 sa 6 sigħat fil-preżenza u fin-nuqqas ta' S9. Il-mezz tat-trattament jitneħħa u jiġi sostitwit b'mezz frisk, u ċ-ċelloli jittieħdu wara 1,5–2,0 ċikli taċ-ċelloli normali.

▼M3

45. Jekk iż-żewġ testijiet inizjali tat-trattament qasir (3–6 sigħat) ikunu negattivi jew ekwivoċi, għandu jintuża trattament ta' esponiment estiż sussegwenti (mingħajr S9). Hemm żewġ għażliet ta' trattament li huma disponibbli, li t-tnejn huma ugwalment aċċettabbli:

— Għażla A: Iċ-ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test għal 1,5–2,0 ċikli taċ-ċelloli normali, u jittieħdu fl-aħħar tal-perjodu tat-trattament.

— Għażla B: Iċ-ċelloli jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test għal 1,5–2,0 ċikli taċ-ċelloli normali. Il-mezz tat-trattament jitneħħa u jiġi sostitwit b'mezz frisk, u ċ-ċelloli jittieħdu wara 1,5–2,0 ċikli taċ-ċelloli normali addizzjonali.

46. Fil-monosaffi, iċ-ċelloli mitotiċi (identifikabbli bħala li huma tondi u maqlugħa mill-wiċċ) jistgħu jkunu preżenti fl-aħħar tat-trattament ta' bejn 3 u 6 sigħat. Minħabba li dawn iċ-ċelloli mitotiċi jistgħu jinqalgħu faċilment, huma jistgħu jintilfu meta jitneħħa l-mezz li jkun fih is-sustanza tat-test. Għandha tingħata attenzjoni għall-ġbir ta' dawn meta jinħaslu l-kulturi, u li dawn jiġu rritornati fil-kulturi, sabiex jiġi evitat li jintilfu ċelloli li jkunu f'mitożi, u li jkunu f'riskju għal mikronuklei, fiż-żmien tal-ħsad.

L-għadd ta' kulturi

47. Għandhom jintużaw kulturi doppji għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u għall-mezz/solvent u l-kulturi NC. Fejn tkun tista' tintwera varjazzjoni minima bejn il-kulturi doppji mill-informazzjoni storika tal-laboratorju, jista' jkun aċċettabbli li jintużaw kulturi singoli. Jekk jintużaw kulturi singoli, huwa rakkomandat li jiġi analizzat għadd akbar ta' konċentrazzjonijiet.

Il-ħsad taċ-ċelloli u l-preparazzjoni tal-lametti

48. Kull kultura tiġi maħsuda u pproċessata separatament. Il-preparazzjoni taċ-ċelloli tista' tinvolvi trattament ipotoniku, iżda dan il-pass mhuwiex neċessarju jekk jinkiseb tifrix adegwat taċ-ċelloli b'mod ieħor. Jistgħu jintużaw tekniki differenti fil-preparazzjoni tal-lametti sakemm jinkisbu preparazzjonijiet taċ-ċelloli ta' kwalità għolja għall-għoti tal-punti. Iċ-ċitoplasma taċ-ċelloli għandha tinżamm sabiex tkun tista' ssir l-iskoperta tal-mikronuklei u l-identifikazzjoni affidabbli (fil-metodu cytokinesis-block) taċ-ċelloli binukleati.

49. Il-lametti jistgħu jingħataw il-kulur bl-użu ta' metodi varji, bħal Giemsa jew żebgħat speċifiċi fluworexxenti tad-DNA (59). L-użu ta' kulur speċifiku ta' DNA (*pereżempju* oranġjo akridin (61) jew Hoechst 33255 plus pyronin-Y (62)) jista' jelimina xi whud mill-prodotti assoċjati mal-użu ta' kulur speċifiku mhux ta' DNA. L-antikorpi antikinetokor, FISH bi probes panċentromeriċi tad-DNA, jew it-tikkettar primed *in situ* bi primers speċifiċi panċentromeriċi, flimkien ma' counterstaining xieraq tad-DNA, jistgħu jintużaw biex jidentifikaw il-kontenuti (kromożomi/framment tal-kromożomi) tal-mikronuklei jekk l-informazzjoni mekkanistika dwar il-formazzjoni tagħhom tkun ta' interess (15)(16). Jistgħu jintużaw metodi oħrajn għal divrenzjar bejn il-klastoġeni u l-anewġeni jekk dawn ikunu wrew li huma effettivi.

Analiżi

50. Il-lametti kollha, inklużi dawk tas-solvent/mezz u l-kontrolli, għandhom ikunu kodifikati b'mod indipendenti qabel l-analiżi mikroskopika. Inkella, il-kampjuni kkodifikati jistgħu jiġu analizzati bl-użu ta' sistema vvalidata u awtomatizzata ta' analiżi tal-immaġini jew ta' analiżi tal-fluss ċitometriku.

▼M3

51. Fil-kulturi ttrattati b'cytoB, il-frekwenzi mikronuklei għandhom jiġu analizzati mill-inqas f'2 000 ċellola binukleata għal kull konċentrazzjoni (mill-inqas 1 000 ċellola binukleata għal kull kultura; żewġ kulturi għal kull konċentrazzjoni). Jekk jintużaw kulturi singoli, għandhom jingħaddu mill-inqas 2 000 ċellola binukleata għal kull konċentrazzjoni minn dik il-kultura. Jekk għall-għoti tal-punti f'kull konċentrazzjoni jkunu disponibbli sostanzjalment inqas minn 1 000 ċellola binukleata għal kull kultura, jew 2 000 f'każ li tintuża kultura singola, u jekk ma tiġi osservata ebda żieda sinifikanti fil-mikronuklei, it-test għandu jiġi ripetut bl-użu ta' aktar ċelloli, jew f'konċentrazzjonijiet inqas tossiċi, skont xi jkun l-aktar xieraq. Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma jingħaddux ċelloli binukleati b'forom irregolari jew fejn iż-żewġ nuklei jkunu jvarjaw ħafna fid-daqs; lanqas ma għandhom iċ-ċelloli binukleati jiġu mħawdin maċ-ċelloli multinukleati mifruxa ħażin. Ċelloli li jkun fihom aktar minn żewġ nuklei ewlenin ma għandhomx jiġu analizzati għall-mikronuklei, minħabba li l-frekwenza bażika tal-mikronukleu tista' tkun ogħla f'dawn iċ-ċelloli (63) (64) L-għadd taċ-ċelloli mononukleati huwa aċċettabbli jekk is-sustanza tat-test turi li tinterferixxi mal-attività tas-cytoB.

52. Fil-linji ta' ċelloli analizzati mingħajr trattament tas-cytoB, il-mikronuklei għandhom jingħaddu mill-inqas f'2 000 ċellola għal kull konċentrazzjoni (mill-inqas 1 000 ċellola għal kull kultura; żewġ kulturi għal kull konċentrazzjoni). Fejn tintuża kultura waħda biss għal kull konċentrazzjoni, għandhom jingħaddu mill-inqas 2 000 ċellola minn dik il-kultura.

53. Meta tintuża s-cytoB, għandhom jiġu stabbiliti CBPI jew RI sabiex tiġi vvalutata l-proliferazzjoni taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 2) bl-użu ta' mill-inqas 500 ċellola għal kull kultura. Meta t-trattamenti jitwettqu fin-nuqqas ta' cytoB, huwa essenzjali li tiġi pprovduta evidenza li ċ-ċelloli li jkunu qegħdin jingħaddu għaddew minn proliferazzjoni, kif diskuss fil-Paragrafi 24-27.

Kriterji ta' aċċettabilità

54. Laboratorju li jipproponi li juża l-analiżi tal-MNvit deskritta fit-TM għandu juri l-kapaċità tiegħu li josserva b'mod affidabbli u preċiż sustanzi kimiċi ta' attività anewġenika u klastoġenika magħrufa, b'attivazzjoni metabolika u mingħajrha, kif ukoll sustanzi kimiċi negattivi, bl-użu tas-sustanzi kimiċi ta' referenza fl-Appendiċi 3. Bħala evidenza tal-abbiltà tiegħu li jwettaq dan it-TM b'mod korrett, il-laboratorju għandu jipprovdi evidenza li ċ-ċelloli li jkunu qegħdin jingħaddu għal formazzjoni mikronuklea jkunu temmew diviżjoni nukleari waħda jekk it-test jitwettaq mingħajr l-użu ta' cytoB.

55. Is-sustanzi kimiċi fl-Appendiċi 3 huma rrakkomandati biex jintużaw bħala sustanzi kimiċi ta' referenza. Jistgħu jiġu inklużi sustanzi kimiċi sostituti jew addizzjonali jekk l-attività tagħhom tkun magħrufa u jekk jinduċu mikronuklei permezz tal-istess mekkaniżmi ta' azzjoni, u jekk dawn juru li huma rilevanti għas-sustanzi kimiċi li għandhom jiġu ttestjati bl-użu tal-proċedura MNvit. Ġustifikazzjoni tista' tinkludi studju ta' validazzjoni li japplika varjetà wiesgħa ta' sustanzi jew iffokat fuq spettru idjaq ibbażat fuq il-klassi kimika tas-sustanza tat-test jew il-mekkaniżmu ta' dannu li jkun qiegħed jiġi studjat.

56. Il-kontroll tas-solvent/mezz u l-kulturi mhux ittrattati għandhom jagħtu frekwenzi ta' mikronuklei konsistenti u riproduċibbilment baxxi (tipikament 5-25 mikronukleu/1 000 ċellola għat-tipi taċ-ċelloli identifikati fil-paragrafu 11). Tipi oħrajn ta' ċelloli jista' jkollhom firxiet differenti ta' reazzjonijiet li għandhom jiġu stabbiliti meta jiġu vvalidati biex jintużaw fl-analiżi tal-MNvit. L-informazzjoni minn kontroll negattiv, solvent u PC għandha tintuża biex tistabbilixxi l-firxiet tal-kontroll storiku. Dawn il-valuri għandhom jintużaw sabiex tiġi deċiża l-adegwatezza tal-NC/PC simultanju għal esperiment.

▼M3

57. Jekk għall-analiżi jiġu proposti bidliet żgħar fil-protokoll (*eż.* l-użu ta' tekniki ta' għoti ta' punti awtomatizzati minflok manwali; l-użu ta' tip ta' ċellola ġdida) l-effikaċja tal-bidla għandha tintwera qabel ma l-protokoll immodifikat ikun jista' jitqies bħala aċċettabbli biex jintuża. It-turija tal-effikaċja tinkludi dimostrazzjoni li jistgħu jiġu osservati l-mekkaniżmi ewlenin tal-ksur tal-kromożomi u l-ksib jew it-telf tagħhom, u li jistgħu jinkisbu riżultati pożittivi u negattivi xierqa għall-klassi tas-sustanza individwali, jew il-firxa wiesgħa ta' sustanzi, li għandhom jiġu ttestjati.

INFORMAZZJONI U RAPPURTAR

It-trattament tar-riżultati

58. Jekk tintuża t-teknika cytokinesis-block, huma biss il-frekwenzi taċ-ċelloli binukleati b'mikronuklei (indipendenti mill-għadd ta' mikronuklei għal kull ċellola) li għandhom jintużaw fl-evalwazzjoni tal-induzzjoni tal-mikronuklei. L-għadd tan-numri ta' ċelloli b'mikronuklea waħda, b'żewġ mikronuklei jew b'aktar mikronuklei jista' jipprovdi informazzjoni utli, iżda mhuwiex obbligatorju.

59. Għandhom jiġu stabbiliti miżuri simultanji ta' ċitotossiċità u/jew ċitostaži għall-kulturi kollha ttrattati jew ta' kontroll tas-solvent/mezz (58). Is-CBPI jew l-RI għandhom jiġu kkalkolati għall-kulturi kollha ttrattati u ta' kontroll bħala kejl tad-dewmien taċ-ċiklu taċ-ċelloli meta jintuża l-metodu cytokinesis-block. Fin-nuqqas ta' cytoB, għandhom jintużaw l-RPD, l-RICC jew il-PI (ara l-Appendiċi 2).

60. Għandha tiġi pprovduta informazzjoni dwar il-kultura individwali. Barra minn hekk, l-informazzjoni kollha għandha tinġabar fil-qosor f'forma ta' tabella.

61. Sustanzi kimiċi li jinduċu mikronuklei fl-analiżi tal-MNvit jistgħu jagħmlu dan minħabba li jinduċu ksur tal-kromożomi, telf tal-kromożomi jew kombinazzjoni tat-tnejn. Tista' tintuża analiżi ulterjuri li tuża antikorpi antikinetokor, ċentromeri speċifiċi fi probes *in situ* jew metodi oħrajn sabiex jiġi stabbilit jekk il-mekkaniżmu tal-induzzjoni tal-mikronuklei huwiex dovut għal attività klastoġenika u/jew anewġenika.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

62. Ma hemm ebda ħtieġa għal verifika permezz ta' ttestjar addizzjonali ta' reazzjoni pożittiva jew negattiva ċara. Ir-riżultati ekwivoċi jistgħu jiġu kkjarifikati permezz ta' analiżi ta' 1 000 ċellola oħra mill-kulturi kollha sabiex jiġi evitat it-telf tal-blinding. Jekk dan l-approċċ ma jsolvix ir-riżultat, ikunu jridu jsiru aktar testijiet. Il-modifika tal-parametri ta' studju fuq firxa wiesgħa jew dejqa ta' kondizzjonijiet, kif xieraq, għandha tiġi kkunsidrata fl-esperimenti ta' segwitu. Il-parametri ta' studju li jistgħu jiġu mmodifikati jinkludu l-ispazjar tal-konċentrazzjoni tat-test, l-għażla taż-żmien tat-trattament u l-ħsad taċ-ċelloli, u/jew il-kondizzjonijiet tal-attivazzjoni metabolika.

63. Hemm bosta kriterji biex jiġi stabbilit riżultat pożittiv, bħal ma hija żieda relatata mal-konċentrazzjoni jew żieda statistikament sinifikanti fl-għadd ta' ċelloli li fihom mikronuklei. L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Il-konsiderazzjoni ta' jekk il-valuri osservati humiex fi ħdan jew barra l-firxa ta' kontroll storiku tista' tipprovdi gwida fl-evalwazzjoni tas-sinifikat bijoloġiku tar-reazzjoni. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet (65) jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. Madankollu, ir-riżultati tat-testijiet statistiċi għandhom jiġu vvalutati fir-rigward tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni. Fatturi oħrajn li għandhom jiġu kkunsidrati huma r-riproduċibbiltà u l-informazzjoni storika.

▼M3

64. Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir ġudizzju definittiv dwar l-attività tas-sustanza tat-test. Ir-reazzjonijiet jistgħu jibqgħu ekwivoċi jew inċerti irrispettivament mill-għadd ta' drabi li jkun ripetut l-esperiment.

65. Ir-riżultati pożittivi mill-analiżi tal-MNvit jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq ksur tal-kromożomi jew telf tal-kromożomi fiċ-ċelloli mammiferi kkulturati. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, taħt il-kondizzjonijiet tat-test użati, is-sustanza tat-test ma toħloq ebda ksur tal-kromożomi u/jew ksib jew telf ta' ċelloli mammiferi kkulturati.

Rapport tat-Test

66. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi mill-inqas l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanza kimika tat-test

— informazzjoni dwar l-identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS) u n-Numru tal-KE,

— in-natura u l-purità fiżika,

— il-karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti għat-twettiq tal-istudju,

— ir-reattività tas-sustanza kimika tat-test mas-solvent/mezz jew il-mezzi tal-kultura taċ-ċelloli,

Solvent/Mezz

— ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-mezz,

— is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/fil-mezz,

Ċelloli

— it-tip u s-sors taċ-ċelloli użati,

— l-adattabilità tat-tip ta' ċelloli użati,

— in-nuqqas ta' majkoplasma, jekk applikabbli,

— informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli, l-irduppjar taż-żmien jew l-indiċi tal-proliferazzjoni,

— fejn jintużaw limfoċiti, is-sess, l-età u l-għadd ta' donaturi tad-demm, jekk applikabbli,

— fejn jintużaw limfoċiti, jekk id-demm sħiħ jew il-limfoċiti separati humiex esposti,

— l-għadd ta' passaġġi, jekk applikabbli,

— il-metodi użati għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli, jekk applikabbli;

— in-numru modali tal-kromożomi,

— iż-żmien normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli (kontroll negattiv),

Kondizzjonijiet tat-Test

— l-identità taċ-ċitokineżi li timblokka s-sustanza (eż. cytoB), jekk tintuża, u l-konċentrazzjoni tagħha, flimkien mat-tul tal-esponiment taċ-ċelloli,

— ir-raġuni għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u l-għadd ta' kulturi, inklużi informazzjoni dwar iċ-ċitotossiċità u l-limitazzjonijiet tas-solubilità, jekk ikunu disponibbli,

— il-kompożizzjoni tal-mezzi, il-konċentrazzjoni tas-CO_2, jekk applikabbli,

— il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test,

▼M3

— il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) tal-mezz u s-sustanza tat-test miżjuda,

— it-temperatura u l-ħin tal-inkubazzjoni,

— it-tul tat-trattament,

— il-ħin tal-ħsad wara t-trattament,

— id-densità taċ-ċelloli waqt l-injettar, jekk applikabbli,

— it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema tal-attivazzjoni metabolika, inklużi l-kriterji tal-aċċettabilità,

— is-sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv u l-kontrolli negattivi,

— il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti u t-teknika użata għall-għoti tal-kulur,

— il-kriterji għall-identifikazzjoni tal-mikronuklei,

— l-għadd ta' ċelloli analizzati,

— il-metodi għall-kejl taċ-ċitotossiċità,

— kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossiċità,

— il-kriterji sabiex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi,

— il-metodu/i tal-analiżi statistika użata,

— il-metodi, bħall-użu ta' antikorp kinetochore, sabiex jikkaratterizzaw jekk il-mikronuklei fihomx kromożomi sħaħ jew frammentati, jekk applikabbli,

Ir-riżultati

— il-kejl taċ-ċitotossiċità użata, *eż.* CBPI jew RI fil-każ tal-metodu cytokinesis-block; RICC, RPD jew PI meta ma jintużawx il-metodi ta' cytokinesis-block; osservazzjonijiet oħrajn meta applikabbli, *eż.* konfluwenza taċ-ċelloli, apoptożi, nekrożi, l-għadd tal-metafaži, il-frekwenza taċ-ċelloli binukleati,

— sinjali ta' preċipitazzjoni,

— informazzjoni dwar il-pH u l-osmolalità tal-mezz tat-trattament, jekk ikun stabbilit,

— definizzjoni taċ-ċelloli aċċettabbli għall-analiżi,

— id-distribuzzjoni taċ-ċelloli mononukleati, binukleati u multinukleati jekk jintuża l-metodu cytokinesis-block,

— l-għadd ta' ċelloli b'mikronuklei mogħtija separatament għal kull kultura ttrattata u kkontrollata, u jekk hux minn ċelloli binukleati jew mononukleati, fejn xieraq,

— ir-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-reazzjoni, fejn possibbli,

— informazzjoni kimika simultanja (konċentrazzjonijiet u solventi) dwar il-kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv,

— informazzjoni kimika storika dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, bil-meded, il-mezzi u l-intervall standard ta' devjazzjoni u kunfidenza (*eż.* 95 %),

— analiżi statistika; il-valuri p, jekk ikun hemm.

Diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet

▼**M3**

LETTERATURA

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1–4.

(2) Parry, J.M. u Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3–15.

(3) Fenech, M. u Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233–246.

(4) Kirsch–Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. u Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167–172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084–1104.

(6) Fenech, M. u Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193–198.

(7) Eastmond, D.A. u Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34–43.

(8) Eastmond, D.A. u Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9–20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. u Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297–302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. u Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329–334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. u Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205–213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. u Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519–525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. u Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9–20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. u Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233–245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. u Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211–219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. u Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153–163.

▼M3

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Linja Gwida tat-Test Nru 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. u Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13–36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. u Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37–60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. u Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61–87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. u Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88–124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. u Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125–152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. u Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187–208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. u Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45–59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. u Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81–116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. u Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183–190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. u Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55–71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. u Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res*., 468, 137–163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. u Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123–134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. u Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569–580.

▼M3

(31) Elhajouji, A., u Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1–152.

(32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16–17 ta' Novembru 2006, Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Disponibbli fuq: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271–283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. u Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105–115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. u Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257–260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. u Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315–328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. u Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61–70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. u Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147–205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. u Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297–305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789–886.

(42) Fenech, M. u Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29–36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11–18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. u Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international bażi tad-dejta comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31–45.

▼M3

(45) Maron, D.M. u Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173–215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. u Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55–65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. u Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175–177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. u Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. u Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. u Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51–59.

(50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponibbli fuq: [http://www.pops.int/]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. u Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247–274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. u McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. u Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91–103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. u Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795–801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35–44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., u Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103–112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. u Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Res.*, 564, 97–100.

(57) Pincu, M., Bass, D. u Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61–65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. u Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1–3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. u Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169–184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191–201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., u Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241–247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., u Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 u Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269–275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. u Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241–247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. u Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65–75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. u Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463–467.

(66) Ir-Regolament (KE) Nru 850/2004 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tad-29 ta' April 2004 dwar pollutanti organiċi persistenti u li jemenda d-Direttiva 79/117/KEE, ĠU L 229, 30.4.2004, p. 5.

▼M3

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Anewġenu: kwalunkwe sustanza jew proċess li, meta jinteraġġixxu mal-komponenti taċ-ċiklu tad-diviżjoni taċ-ċellola mitotika u mejotika, iwasslu għal anewplojdija f'ċelloli jew organiżmi.

Anewplojdija: kwalunkwe devjazzjoni mill-għadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wieħed jew minn aktar minn kromożomu wieħed, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliplojdija).

Apoptożi: mewta taċ-ċelloli kkaratterizzati minn serje ta' passi li jwasslu għal diżintegrazzjoni taċ-ċelloli fil-partikoli mwaħħlin mal-membrana li jiġu mbagħad eliminati permezz ta' fagoċitożi jew permezz ta' tixrid.

Proliferazzjoni taċ-ċelloli: żieda fl-għadd ta' ċelloli bħala riżultat ta' diviżjoni mitotika taċ-ċelloli.

Ċentromer: reġjun tad-DNA ta' kromożomu wieħed fejn iż-żewġ kromatidi jinżammu flimkien u li fuqu hemm imwaħħlin ġenb ma' ġenb iż-żewġ kinetokori.

Klastoġen: kull sustanza jew proċess li tikkawża aberrazzjonijiet kromosomali strutturali fil-popolazzjoni ta' ċelloli jew organiżmi.

Ċitokineżi: il-proċess ta' diviżjoni taċ-ċelloli minnufih wara mitożi sabiex jifforma żewġ ċelloli żgħar, fejn kull waħda jkun fiha nukleu wieħed.

Indiċi ta' Proliferazzjoni Blokk taċ-Ċitokineżi (Cytokinesis-Block Proliferation index (CBPI)): il-proporzjon ta' ċelloli tat-tieni diviżjoni fil-popolazzjoni ttrattata fir-rigward tal-kontroll mhux ittrattat (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Ċitostażi: inibizzjoni tat-tkabbir taċ-ċelloli (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Ċitotossiċità: effetti ta' ħsara għall-istruttura jew għall-funzjoni taċ-ċelloli, li fl-aħħar mill-aħħar jikkawżaw il-mewta taċ-ċelloli.

Ġenotossiċità: terminu ġenerali li jinkludi kull tip ta' ħsara fid-DNA jew kromożoma, inkluż ksur, riarranġamenti tal-adduttorji, mutazzjonijiet, aberrazzjonijiet tal-kromożomi, u anewplojdija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew ħsara fil-kromożomi stabbli.

Ċelloli interfaża: ċelloli li mhumiex fil-faża mitotika.

Kinetochore: struttura li fiha l-proteini li tingħaqad fiċ-ċentromer ta' kromożoma fejn il-fibri "spindle" jassoċjaw waqt id-diviżjoni taċ-ċelloli, u dan jippermetti moviment ordnat tal-kromożomi li jfaqqsu (daughter chromosomes) għall-poli taċ-ċelloli li jfaqqsu (daughter cells).

Mikronuklei: nuklei żgħar, separati minn u addizzjonali għan-nuklei prinċipali ta' ċelloli, prodotti waqt it-telofaża ta' mitożi jew mejożi permezz frammenti ta' kromożomi li jibqa' jew kromożomi sħaħ.

Mitożi: diviżjoni tan-nukleu taċ-ċelloli li normalment jinqasam f'profaża, prometafaża, metafaża, anafaża u telofaża.

Indiċi mitotiku: il-proporzjon ta' ċelloli fil-metafaża diviżi bl-għadd totali ta' ċelloli osservati f'popolazzjoni ta' ċelloli; indikazzjoni tal-ammont ta' proliferazzjoni ta' ċelloli ta' dik il-popolazzjoni.

Mutaġeniku: jipproduċi bidla ereditarja ta' sekwenza(i) tal-pari tal-bażi tad-DNA f'ġeni jew tal-istruttura tal-kromożomi (aberrazzjonijiet tal-kromożomi).

▼**M3**

Nondisġunzjoni: nuqqas min-naħa tal-kromatidi f'pari milli jinfirdu u jissegregaw ruħhom sew sabiex jiżviluppaw ċelloli żgħar, u dan jirriżulta f'ċelloli żgħar b'għadd anormali ta' kromożomi.

Poliplojdija: aberrazzjonijiet numeriċi tal-kromożomi f'ċelloli jew organiżmi li jinvolvu sett(ijiet) sħiħ(sħaħ) ta' kromożomi, meta mqabbla mal-kromożomu jew kromożomi individwali (anewplojdija).

Indiċi ta' Proliferazzjoni (PI): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax cytoB (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (Relative Increase in Cell Count — RICC): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax cytoB (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (Relative Population Doubling — RPD): metodu għall-kejl taċ-ċitotossiċità meta ma tintużax cytoB (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Indiċi tar-Replikazzjoni (RI): il-proporzjon taċ-ċikli tad-diviżjoni taċ-ċelloli mwettqa f'kultura ttrattata, fir-rigward tal-kontroll mhux trattat, matul il-perjodu ta' esponiment u l-irkupru (ara Appendiċi 2 għall-formula).

Sustanza kimika tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

▼M3

Appendiċi 2

Formoli għal valutazzjoni taċ-ċitotossiċità

1. *Meta tintuża cytoB*, l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità għandha tkun ibbażata fuq l-Indiċi ta' Profilerazzjoni Blokk taċ-Ċitokineżi (Cytokinesis-Block Proliferation Index — CBPI) jew l-Indiċi Replikattiv (Replicative Index — RI) (16) (58). Is-CBPI jindika l-għadd medju ta' ċikli taċ-ċelloli għal kull ċellola matul il-perjodu ta' esponiment għal cytoB, u jista' jintuża biex jikkalkula l-proliferazzjoni taċ-ċelloli. L-RI jindika l-għadd relattiv ta' nuklei fil-kulturi ttrattati meta mqabbel mal-kulturi ta' kontroll u jista' jintuża biex jikkalkula l-% taċ-ċitostażi:

$$\% \text{ ta' Ċitostażi} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

U:

T = kultura tat-trattament kimiku bi prova

C = kultura ta' kontroll tal-mezz

Meta:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{Nru ta' ċellolimononukleati}) + (2 \times \text{Nru ta' ċelloli binukleati}) + (3 \times \text{Nru ta' ċelloli multinukleati}))}{(\text{Numru totali ta' ċelloli})}$$

Għaldaqstant, CBPI ta' 1 (iċ-ċelloli kollha huma mononukleati) huwa ekwivalenti għal ċitostażi ta' 100 %.

$$\text{Ċitostażi} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{Nru ta' ċelloli binukleati}) + (2 \times \text{Nru ta' ċelloli multinukleati})) \div (\text{Numru totali ta' ċelloli})_T}{((\text{Nru ta' ċelloli binukleati}) + (2 \times \text{ Nru ta' ċelloli multinukleati})) \div (\text{Numru totali ta' ċelloli})_C} \times 100$$

T = kulturi ttrattati

C = kulturi ta' kontroll

2. B'hekk, RI ta' 53 % ifisser li, meta mqabbel mal-għadd ta' ċelloli li jkunu nqasmu biex jiffurmaw ċelloli binukleati u multinukleati fil-kultura ta' kontroll, 53 % biss ta' dan l-għadd ġew diviżi fil-kultura trattata, jiġifieri ċitostażi ta' 47 %.

3. *Meta ma tintużax cytoB*, hija rrakkomandata evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità fuq il-bażi taż-Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (Relative Increase in Cell Counts — RICC) jew fuq l-Irduppjar tal-Popolazzjoni Relattiva (Relative Population Doubling — RPD) (58), minħabba li t-tnejn iqisu l-proporzjon tal-popolazzjoni taċ-ċelloli li tkun iddividiet ruħha.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{Żieda fl} - \text{għadd ta' ċelloli fil} - \text{kulturi ttrattati (finali} - \text{bidu))}}{(\text{Żieda fl} - \text{għadd ta' ċelloli fil} - \text{kulturi ta' kontroll(finali} - \text{bidu))} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{Nru ta' rduppjar fil} - \text{Popolazzjoni fil} - \text{kulturi ttrattati})}{(\text{Nru ta' rduppjar fil} - \text{Popolazzjoni fil} - \text{kulturi ta' kontroll})} \times 100$$

▼**M3**

fejn:

Irduppjar tal-popolazzjoni = [log (Numru ta' ċelloli wara t-trattament ÷ Numru ta' ċelloli inizjali)] ÷ log 2

4. B'hekk, RICC, jew RPD ta' 53 % jindika 47 % ċitotossiċità/ċitostaži.

5. Billi jintuża Indiċi ta' Proliferazzjoni (Proliferation Index — PI), iċ-ċitotossiċità tista' tiġi vvalutata pemrezz tal-għadd (scoring) tan-numru ta' kloni li jikkonsistu f'ċellola 1 (cl1), 2 ċelloli (cl2), 3 sa 4 ċelloli (cl4) u 5 sa 8 ċelloli (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. Il-PI ntuża bħala parametru siewi u affidabbli taċ-ċitotossiċità wkoll għal linji ta' ċelloli kkulturati *in situ* fin-nuqqas ta' cytoB (25) (26) (27) (28).

▼M3

Appendiċi 3

Sustanzi kimiċi ta' referenza rrakkomandati għall-valutazzjoni tal-prestazzjoni ([1])

Kategorija	Sustanza Kimika	Nru tal-CAS	Nru tal-KE
1. Klastoġeni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika			
	Ċitosina arabinosida	147-94-4	205-705-9
	Mitomiċina C	50-07-7	200-008-6
2. Klastoġeni li jeħtieġu attivazzjoni metabolika			
	Benżo(a)piren	50-32-8	200-028-5
	Ċiklofosfammid	50-18-0	200-015-4
3. Anewġeni			
	Kolkiċina	64-86-8	200-598-5
	Vinblastina	143–67-9	205-606-0
4. Sustanzi negattivi			
	Di-(2-etileżil)ftalat	117-81-7	204-211-0
	Aċidu nalidissiku	389-08-2	206-864-7
	Piren	129-00-0	204-927-3
	Klorur tas-sodju	7647-14-5	231-598-3

([1]) Is-sustanzi kimiċi ta' referenza huma s-sustanzi kimiċi rrakkomandati għall-użu. Is-sostituzzjoni jew iż-żieda ta' sustanzi kimiċi fil-lista ta' sustanzi kimiċi ta' referenza tista' ssir jekk l-attività tagħhom tkun magħrufa u jekk huma jinduċu lill-mikronuklei bl-istess mekkaniżmi ta' azzjoni, u jekk jintwerew li huma rilevanti għas-sustanzi kimiċi li jkunu sejrin jiġu ttestjati permezz tal-proċedura MNvit. Skont x'ikun l-għan, il-ġustifikazzjoni tista' tinkludi wkoll studju ta' validazzjoni li juża firxa wiesgħa ta' sustanzi jew iffukat fuq spettru iktar dejjaq ibbażat fuq il-klassi tas-sustanza kimika jew il-mekkaniżmu ta' ħsara li jkun qiegħed jiġi studjat.

▼M3

B.50. **SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODI TAL-LIMFA LOKALI: DA**

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. L-ewwel Metodu tat-Test (TM) (B.42) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali (Local Lymph Node Assay — LLNA; Linja gwida 429 tat-Test tal-OECD) ġie rivedut (1). Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u analiżi tax-xogħol assoċjat ġew ippubblikati (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Fl-LLNA, tintuża t-timidina jew jojdu radjoisotopiku biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti u għaldaqstant, l-analiżi għandha użu limitat fejn l-akkwiżizzjoni, l-użu jew l-eliminazzjoni tar-radjuattività huma problematiċi. L-LLNA: DA (żviluppat minn Daicel Chemical Industries, Ltd.) huwa modifikazzjoni mhux radjuattiva għal-LLNA, li tikkwantifika l-kontenut tat-trifosfat tal-adenożina (adenosine triphosphate, ATP) permezz ta' bijoluminexxenza bħala indikatur tal-proliferazzjoni tal-limfoċiti. Il-metodu ta' ttestjar LLNA: DA ġie vvalidat u analizzat u rakkomandat minn panil internazzjonali ta' analiżi minn pari bħala utli għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi sensitizzanti u mhux sensitizzanti, b'ċerti limitazzjonijiet (10) (11) (12) (13). Dan it-TM huwa mfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness u Linja Gwida 406 tat-Test OECD jużaw fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni tal-fniek tal-Indi u t-test Buehler (14). L-LLNA (Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 429 tat-Test OECD) u ż-żewġ modifikazzjonijiet mhux radjuattivi, LLNA: DA (Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 A tat-Test OECD) u LLNA: BrdU-ELISA (Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 B tat-Test OECD), kollha jipprovdu vantaġġ fuq it-testijiet tal-fniek tal-Indi f'B.6 u fil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14) f'termini ta' tnaqqis u rfinar tal-użu tal-annimali.

2. B'mod simili għal-LLNA, l-LLNA: DA tistudja l-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva adattata għall-valutazzjoni tad-doża u r-reazzjoni. Barra minn hekk, abilità li jinkixfu sensitizzaturi tal-ġilda mingħajr il-ħtieġa li tintuża radjutikketta għad-DNA telimina l-potenzjal għal esponiment fuq il-post tax-xogħol għal kwistjonijiet ta' radjuattività u ta' rimi ta' skart. Min-naħa tiegħu, dan jista' jippermetti għall-użu miżjud ta' ġrieden għall-individwazzjoni ta' sensitizzaturi tal-ġilda, li jnaqqas ulterjorment l-użu tal-fniek tal-Indi għal testijiet għal potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD) (14).

DEFINIZZJONIJIET

3. Definizzjonijiet użati huma pprovduti f'Appendiċi 1.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA: DA huwa metodu tal-LLNA modifikat għall-identifikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni fil-ġilda, b'limitazzjonijiet speċifiċi. Dan mhux neċessarjament jimplika li fil-każijiet kollha, l-LLNA: DA għandha tintuża minflok it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-test OECD) (14), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma (10) (11). Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha

▼M3

tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA: DA huwiex adattat għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA: DA [ara paragrafu 5]) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA: DA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Huwa għandu, madankollu, il-potenzjal li jnaqqas l-għadd ta' annimali meħtieġa għal dan il-għan meta mqabbel mat-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (B.6; Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (14). Barra minn hekk, l-LLNA: DA toffri rfinar sostanzjali (inqas uġigħ u dwejjaq) fil-mod kif l-annimali jintużaw għal provi ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku, minħabba li b'differenza mill-B.6 u mil-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD, l-LLNA: DA ma jeħtieġx li reazzjonijiet ta' sensittività eċċessiva dermali indotti mill-isfida jiġu indikati. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA: DA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14), hemm xi limitazzjonijiet li jistgħu jeħtieġu l-użu ta' B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (eż. l-ittestjar ta' ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal xi sustanzi tat-tip tensjoattivi] (6) (1 u l-Kapitolu B.42 f'dan l-Anness), solubilità tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (16) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14)). Limitazzjonijiet li ġew identifikati għal-LLNA (1, u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness) ġew rakkomandati sabiex japplikaw ukoll għal-LLNA: DA (10). Barra minn hekk, l-użu tal-LLNA: DA ma jkunx xieraq għal sustanzi ta' ttestjar li jaffettwaw il-livelli tal-ATP (eż. sustanzi li jiffunzjonaw bħala inibituri tal-ATP) jew dawk li jaffettwaw il-kejl preċiż ta' ATP intraċellolari (eż. il-preżenza ta' enzimi ta' degradazzjoni tal-ATP, il-preżenza ta' ATP ekstraċellolari fin-nodi tal-limfa). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA: DA għandu jkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi li jistgħu jinterferixxu mal-eżattezza tal-LLNA: DA. Barra minn hekk, għandha tingħata konsiderazzjoni għall-possibilità ta' riżulatati pożittivi tal-limitu meta jinkisbu valuri ta' Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI) ta' bejn 1,8 u 2,5 (ara l-paragrafi 31-32). Dan huwa bbażat fuq il-bażi ta' dejta ta' validazzjoni ta' 44 sustanza li jużaw SI ≥ 1,8 (ara paragrafu 6) li għalihom, l-LLNA: DA identifika b'mod korrett it-32 sensitizzatur tal-LLNA, iżda b'mod inkorrett identifika tlieta minn 12-il nonsensitizzaturi tal-LLNA b'valuri tal-SI ta' bejn 1,8 u 2,5 (jiġifieri linja tal-limitu pożittiva) (10). Madankollu, minħabba li l-istess sett ta' dejta ntuża għall-issettjar tal-valuri SI u għall-kalkolu tal-karatteristiċi ta' tbassir tat-test, ir-riżultati ddikjarati jistgħu jkunu stima eċċessiva tal-karatteristiċi ta' tbassir reali.

PRINĊIPJU TA' DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA: DA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjaħ l-SI, jiġi stabbilit, u għandu

▼M3

jkun ≥ 1,8 qabel ma tkun meħtieġa evalwazzjoni ulterjuri tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu tal-kejl tal-kontenut ta' ATP b'bijoluminexxenza (magħrufa li tikkorrelata mal-għadd ta' ċelloli ħajjin) (17) sabiex jiġi indikat għadd miżjud ta' ċelloli ta' proliferazzjoni fin-nodi tal-limfa awrikulari li jnixxu (18) (19). Il-metodu bijoluminexxenti juża l-enzima luċiferaži biex jikkatalizza l-formazzjoni tad-dawl minn ATP u luċiferin skont ir-reazzjoni li ġejja:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Dawl$$

L-intensità tad-dawl emess hija relatata b'mod lineari mal-konċentrazzjoni tal-ATP u hija mkejla permezz ta' luminometru. L-analiżi ta' luċiferin-luċiferaži hija metodu sensittiv għall-kwantifikazzjoni tal-ATP użata f'firxa wiesgħa ta' applikazzjonijiet (20).

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi tal-għażla għal dan it-test. Studji ta' validazzjoni għal-LLNA: DA twettqu esklussivament bir-razza CBA/J li għaldaqstant hija kkunsidrata r-razza ppreferuta (12) (13). Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħar, li huma nulliparuži u mhumiex tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 ġimgħat u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA: DA.

Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (21), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 %, għajr waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel il-bidu tat-trattament, l-annimali kollha jiġu eżaminati sabiex ikun żgurat li huma ma jkollhom l-ebda feriti osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, ħlief dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

▼M3

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli għal sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex din turi l-kompetenza tal-laboratorju biex iwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Xi awtoritajiet regolatorji jeħtieġu wkoll PC għal kull studju u għaldaqstant, l-utenti huma mħeġġa jikkonsultaw mal-awtoritajiet rilevanti qabel iwettqu l-LLNA: DA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu tali rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandha tipproduċi reazzjoni tal-LLNA: DA pożittiva f'livell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 1,8 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni hija riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 10 ikun jitqies eċċessiv). PC ippreferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Numru tal-Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) u 25 % ewġenol (numru tal-CAS 97-53-0,) fl-aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Filwaqt li l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA: DA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA: DA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storika stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA: DA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC f'mill-inqas 10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena waħda).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA: DA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom jiġu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati negattivi ta' studju ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodika aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodika mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubjuż. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom ikunu kkunsidrati b'attenzjoni meta jkun deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (22).

▼M3

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat f'mezz li huwa magħruf li jeliċita reazzjoni konsistenti (eż. l-aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom it-testijiet b'mezz mhux regolari (formulazzjoni klinika/kimikament rilevanti) ikunu meħtieġa wkoll (23). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanju.

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex jinstab il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

— xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,

— karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,

— dejta ta' appoġġ mil-LLNA: DA,

— dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli tad-doża

17. Għal kull grupp ta' dożi għandhom jintużaw tal-inqas erba' annimali, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u PC (simultanja jew reċenti, ibbażata fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dożi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Apparti n-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom jiġu mmaniġġjati u trattati b'mod identiku bħall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi (2) u (24). Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżiko-kimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (24) (25). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), N,N-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (6) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet, jista' jkun meħtieġ li jsir użu minn solvent kimikament rilevanti jew mill-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test hija kkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi idrofiliċi jkunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi likwidi għalkollox għandhom jiġu evitati.

▼M3

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara paragrafu 33). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tinġabar dejta dwar annimali individwali (22). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Ġbir regolari ta' dejta dwar annimali individwali jipprovdi vantaġġ mil-lat tal-benesseri tal-annimal billi jevita ttestjar doppju li jkun meħtieġ li kieku r-riżultati tas-sustanza tat-test li tkun inġabret oriġinarjament b'xi mod (eż. permezz ta' dejta miġbura dwar l-annimali) kellhom jiġu kkunsidrati aktar tard mill-awtoritajiet regolatorji ma' rekwiżiti oħrajn (eż. dejta individwali dwar l-annimali).

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun stabbilita l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara paragrafu 18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi definit il-livell ta' doża xierqa li għandha tiġi ttestjata fl-LLNA: DA. L-iskop tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell tad-doża massima li għandha tintuża fl-istudju ewlieni tal-LLNA: DA, meta l-informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li tikkawża tossiċità sistemika (ara paragrafu 24) u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda (ara paragrafu 23) ma tkunx disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir taħt l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA: DA, ħlief għall-fatt li ma hemmx valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 8). Iż-żewġ widniet ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (25). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta' gejġ ta' ħxuna (eż. mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) f'Jum 1 (qabel id-doża), f'Jum 3 (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), f'Jum 7 (24 siegħa qabel it-tmiem) u f'Jum 8. Barra minn hekk, f'Jum 8, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥ 3 u/jew ħxuna tal-widna ta' ≥ 25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (26) (27). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA: DA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-Eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2

▼M3

Osservazzjoni	Punteġġ
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġjat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta' 25 % fil-ħxuna tal-widna (26) (27), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (67) (31) (69) (70) (71).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (35) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA: DA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispneja, nifs maqtugħ, u ħsejjes mill-pulmun (rales)), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' > 5 % fil-piż tal-ġisem minn Jum 1 sa Jum 8 u mortalità, għandhom jiġu kkunsidrati fl-evalwazzjoni. Annimali moribondi jew annimali li juru sinjali ta' uġigħ jew dieqa severa għandhom jinqatlu b'mod uman (36).

Skeda sperimentali tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda sperimentali tal-analiżi hija kif ġej:

— *Jum 1:* Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika soluzzjoni milwiema ta' 1 % sodju lauril sulfat (SLS) fuq il-parti ta' wara ta' kull widna billi tuża pinzell imbill fis-soluzzjoni ta' SLS sabiex tkopri d-dorsum ta' kull widna b'erba' jew ħames pinzellati. Siegħa wara t-trattament bl-SLS, applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11–15), fuq in-naħa ta' wara ta' kull widna.

— *Jiem 2, 3 u 7:* Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni ta' qabel it-trattament bis-sustanza milwiema ta' 1 % SLS u tas-sustanza tat-test imwettqa f'Jum 1.

— *Jiem 4, 5 u 6:* L-ebda trattament.

— *Jum 8:* Ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Bejn wieħed u ieħor 24 sa 30 siegħa wara l-bidu tal-applikazzjoni f'Jum 7, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' barra n-nodi limfatiċi awrikulari li jkunu qed inixxu minn kull widna tal-ġurdien u pproċessa separatament f'soluzzjoni ta' ilma bil-melħ ibbaferjata bil-fosfat (PBS) għal kull annimal. Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (22). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta' ġejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

▼M3

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Minn kull ġurdien, titħejja sospensjoni ta' ċellola singola ta' ċelloli tan-nodi limfatiċi (LNC — lymph node cells) maqtugħin bilateralment billi n-nodi limfatiċi jitpoġġew mgħaffġin bejn żewġ slajds tal-ħġieġ u tiġi applikata pressjoni ħafifa sabiex in-nodi jitgħaffġu. Wara li jiġi kkonfermat li t-tessut infirex irqiq, irqiq, issepara ż-żewġ slajds minn ma' xulxin. Issospendi t-tessut fuq iż-żewġ slajds fil-PBS billi żżomm kull slajd f'angolu fuq id-dixx Petri u filwaqt li tlaħlaħ b'PBS waqt li fl-istess ħin tqaxxar it-tessut mill-islajd bi scraper taċ-ċelloli. Barra minn hekk, in-nodi limfatiċi f'annimali NC huma żgħar, għalhekk operazzjoni attenta hija importanti sabiex ikun evitat kwalunkwe effett artifiċjali fuq il-valuri SI. Għandu jintuża volum total ta' 1 mL PBS għat-tlaħliħ taż-żewġ slajds. Is-sospensjoni tal-LNC fid-dixx Petri għandha tiġi omoġenizzata kemmxejn bl-iscraper taċ-ċelloli. Imbagħad jinġabar alikwott ta' 20 µL tas-sospensjoni tal-LNC b'mikropipetta, filwaqt li wieħed joqgħod attent li ma jiħux il-membrana li hija viżibbli għall-għajn, u sussegwentament jitħallat ma' 1,98 mL tal-PBS biex jagħti kampjun ta' 2 mL. Imbagħad jitħejja t-tieni kampjun ta' 2 mL, billi tintuża l-istess proċedura sabiex jitħejjew żewġ kampjuni għal kull annimal.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni ċellolari (kejl tal-kontenut tal-ATP tal-limfoċiti)

27. Żidiet fil-kontenut ta' ATP fin-nodi limfatiċi jitkejlu bil-metodu luċiferin/luċiferaži li juża kit tal-kejl tal-ATP, li jkejjel il-bijoluminexxenza f'Unitajiet ta' Luminexxenza Relattiva (Relative Luminescence Units — RLU). Il-ħin tal-analiżi mill-ħin tal-qatla tal-annimal sal-kejl tal-kontenut ta' ATP għal kull annimal individwali għandu jinżamm uniformi, fi żmien bejn wieħed u ieħor 30 minuta minħabba li l-kontenut ta' ATP huwa meqjus li gradwalment jonqos mal-ħin wara l-qatla tal-annimal (12). B'ħekk, is-serje ta' proċeduri mill-qtugħ tan-nodi limfatiċi awrikulari sal-kejl tal-ATP għandha titlesta fi żmien 20 minuta permezz tal-iskeda ta' żmien predeterminata li hija l-istess għal kull annimal. Il-luminexxenza tal-ATP għandha titkejjel f'kull kampjun ta' 2 mL sabiex jinġabar total ta' żewġ kejlijiet ta' ATP għal kull annimal. Il-luminexxenza tal-ATP medja tiġi mbagħad stabbilita u użata f'kalkoli sussegwenti (ara paragrafu 30).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

28. Kull ġurdien għandu jiġi osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjanijiet ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (36).

Piżijiet tal-ġisem

29. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

30. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI medja. L-SI jinkiseb billi wieħed jiddividi l-RLU/ġurdien medju f'kull grupp tas-sustanza tat-test, u l-grupp tal-PC, bl-RLU/ġurdien medju għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed.

▼M3

31. Il-proċess tad-deċiżjoni jqis riżultat bħala pożittiv meta SI ≥ 1,8 (10). Madankollu, il-qawwa tar-relazzjoni tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali (jiġifieri valur SI bejn 1,8 u 2,5) jiġix iddikjarat pożittiv (2) (3) (37).

32. Għal rispons pożittiv marġinali bejn SI ta' 1,8 u 2,5, l-utenti jistgħu jkunu jridu jikkunsidraw informazzjoni addizzjonali bħar-relazzjoni doża-reazzjoni, evidenza ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni eċċessiva, u fejn xieraq, sinifikat statistiku flimkien ma' valuri SI sabiex jiġi kkonfermat li tali riżultati huma pożittivi (10). Għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensititizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall f'parti oħra (4).

33. Il-ġbir ta' dejta fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti li ssir analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull valutazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari kontra tqabbil ta' kontroll ta' solvent simultanju/VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-valutazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ, ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi bi jew mingħajr ċerti punti ta' dejta (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

34. Id-dejta għandha tingħata fil-qosor f'għamla ta' tabella li turi l-valuri tal-RLU tal-annimal individwali, l-RLU medju tal-grupp/annimal, it-terminu ta' żball assoċjat tiegħu (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mas-solvent/grupp ta' kontroll tal-mezz simultanju.

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi kimiċi tat-test u ta' kontroll

— dejta tal-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott),

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, stabbilità, solubilità),

— jekk taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti,

Solvent/mezz

— dejta tal-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat),

— raġuni għall-għażla tal-mezz,

▼M3

Annimali tat-test

— is-sors tal-ġrieden tas-CBA,

— l-istatus mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf,

— l-għadd u l-età tal-annimali,

— is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.,

Kondizzjonijiet tat-test,

— is-sors, in-numru tal-lott u assigurazzjoni tal-kwalità tal-manifattur/dejta ta' kontroll tal-kwalità għall-kit tal-ATP,

— dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,

— raġuni għall-għażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),

— il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikat,

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),

— dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni,

— metodi ta' kejl tat-tossiċità,

— kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi,

— dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju,

Verifika tal-affidabilità:

— sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użati,

— PC simultanju u/jew storiku u dwar dejta negattiva simultanja (solvent/mezz) għal-laboratorju li qed jagħmel it-test,

— jekk ma kinitx inkluża PC simultanja, id-data u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodika reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta tal-PC storika għal-laboratorju li tiġġustifika l-bażi għaliex ma saritx PC simultanja,

Ir-riżultati,

— piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla skedata; kif ukoll it-terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,

— il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal,

— ħin tat-tmiem tal-annimal u ħin tal-kejl ATP għal kull annimal,

— tabella tal-valuri RLU tal-ġurdien individwali u valuri SI għal kull grupp ta' trattament tad-doża,

— terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal RLU/ġurdien għal kull grupp tat-trattament u r-riżultati tal-analiżi ta' barra għal kull grupp ta' trattament,

▼M3

— l-SI kkalkulat u kejl xieraq tal-varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,

— analiżijiet statistiċi, fejn xieraq,

Diskussjoni tar-riżultati

— kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90–96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127–132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346–370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13–31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60–68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563–79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (38).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Negattiv falz: Sustanza identifikata ħażin bħala negattiva jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor: Kejl ta' kemm il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor hija determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm it-test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (38).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (38).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħrajn f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Assigurazzjoni tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li permezz tiegħu huma vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Affidabilità: Miżuri li bihom, metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, meta jwettqu l-istess protokoll. Din hija vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (38).

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku ta' induzzjoni, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jivvaluta l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dak fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

▼M3

B.51. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULU LIMFATIKU LOKALI BRDU-ELISA

INTRODUZZJONI

1. Il-Linji gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, ħtiġijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. L-ewwel Metodu ta' Ttestjar (TM) (B.42) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali (Local Lymph Node Assay — LLNA; Linja gwida 429 tat-Test tal-OECD) ġie rivedut (1 u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness). Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u l-analiżi tax-xogħol assoċjat magħha ġew ippubblikati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Fl-LLNA, tintuża timidina jew jojdu radjoisotopiku biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti u għaldaqstant, l-analiżi għandha użu limitat fejn l-akkwiżizzjoni, l-użu jew l-eliminazzjoni tar-radjuattività huma problematiċi. L-LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Analiżi Immunosorbenti Relatata ma' Enzima)] huwa modifika mhux radjuattiva għat-TM tal-LLNA, li tuża 5-bromo-2-deossiuridina (BrdU) mhux radjutikkettata (Chemical Abstracts Service [CAS] Nru 59-14-3) f'sistema ta' test ibbażata fuq ELISA biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti. L-LLNA: BrdU-ELISA ġie vvalidat u rivedut u rakkomandat minn panil internazzjonali ta' analiżi minn pari xjentifika u indipendenti meqjus utli għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi sensitizzanti u mhux sensitizzanti, b'ċerti limitazzjonijiet (10) (11) (12). Dan it-TM huwa mfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD jużaw fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni tal-fniek tal-Indi u t-test Buehler (13). L-LLNA (Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 429 tat-Test OECD) u ż-żewġ modifikazzjonijiet mhux radjuattivi, LLNA: BrdU-ELISA (Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 B tat-Test OECD) u LLNA: DA (Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 A tat-Test OECD), kollha jipprovdu vantaġġ fuq it-testijiet tal-fniek tal-Indi f'B.6 u fil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD 13) f'termini ta' tnaqqis u rfinar tal-użu tal-annimali.

2. B'mod simili għal-LLNA, l-LLNA: BrdU-ELISA tistudja l-faži tal-induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdi dejta kwantitattiva xierqa għall-valutazzjoni tar-reazzjoni tad-doża. Barra minn hekk, abilità li jinkixfu sensitizzaturi tal-ġilda mingħajr il-ħtieġa li tintuża radjutikketta għad-DNA telimina l-potenzjal għal esponiment fuq il-post tax-xogħol għal kwistjonijiet ta' radjuattività u ta' rimi ta' skart. Min-naħa tiegħu, dan jista' jippermetti għall-użu miżjud ta' ġrieden għall-kxif ta' sensitizzaturi tal-ġilda, li jnaqqas ulterjorment l-użu tal-fniek tal-Indi għal testijiet għal potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD) (13).

DEFINIZZJONIJIET

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA: BrdU-ELISA huwa metodu tal-LLNA modifikat għall-identifikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanzi kimiċi li huma sensitizzanti għall-ġilda, b'limitazzjonijiet speċifiċi. Din id-doża mhux neċessarjament timplika li f'kull każ, l-LLNA: BrdU-ELISA għandha tintuża minflok l-LLNA jew it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-test OECD) (13), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jeħtieġu aktar konferma (10) (11). Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi

▼M3

kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wieħed jiddetermina jekk l-LLNA: BrdU-ELISA hijiex adattata għas-sustanza (minħabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA: BrdU-ELISA [ara paragrafu 5]) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA: BrdU-ELISA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku. Madankollu, għandu l-potenzjal li jnaqqas l-użu tal-annimali għal dan il-għan meta mqabbel mat-testijiet bil-fniek tal-Indi (B.6; Linja gwida 406 tal-OECD) (13). Barra minn hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA joffri rfinar sostanzjali tal-mod kif jintużaw l-annimali għall-ittestjar ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allerġiku, minħabba li b'differenza minn B.6. u mil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD, l-LLNA: BrdU-ELISA ma jeħtieġx li r-reazzjonijiet ta' ipersensittività dermali indotti bi sfida jkunu enfasizzati. Barra minn hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA ma jeħtieġx l-użu ta' aġġuvant, bħal fil-każ tat-test tal-massimizzazzjoni tal-fenek tal-Indi (Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness,13). B'hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA inaqqas id-dieqa tal-annimal. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA: BrdU-ELISA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13), hemm xi limitazzjonijiet li jistgħu jeħtieġu l-użu ta' B.6 u l-Linja Gwida 13 tat-Test OECD (eż. l-ittestjar ta' ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal xi sustanzi tat-tip tensjoattivi] (6) (1, u l-Kapitolu B.42 f'dan l-Anness), solubilità tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (15) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13)). Limitazzjonijiet li ġew identifikati għal-LLNA (1, u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness) ġew rakkomandati sabiex japplikaw ukoll għal-LLNA: BrdU-ELISA (10). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA: BrdU-ELISA għandu jkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza kimika diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi kimiċi li jistgħu jinterferixxu mal-preċiżjoni tal-LLNA: BrdU-ELISA. Barra minn hekk, għandha tingħata konsiderazzjoni għall-possibilità ta' riżultati pożittivi tal-limitu meta jinkisbu valuri ta' Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI) ta' bejn 1,6 u 1,9 (ara l-paragrafi 31-32). Dan huwa bbażat fuq il-bażi ta' dejta ta' validazzjoni ta' 43 sustanza li jużaw SI ≥ 1,6 (ara paragrafu 6) li għalihom, l-LLNA: BrdU-ELISA identifika b'mod korrett it-32 sensitizzatur tal-LLNA, iżda b'mod inkorrett identifika tnejn minn 11-il nonsensitizzatur tal-LLNA b'valuri tal-SI ta' bejn 1,6 u 1,9 (jiġifieri linja tal-limitu pożittiva) (10). Madankollu, minħabba li l-istess sett ta' dejta ntuża għall-issettjar tal-valuri SI u għall-kalkolu tal-karatteristiċi ta' tbassir tat-test, ir-riżultati ddikjarati jistgħu jkunu stima eċċessiva tal-karatteristiċi ta' tbassir reali.

PRINĊIPJI TA' DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA: BrdU-ELISA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allerġen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wieħed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wieħed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjaħ l-SI, jiġi stabbilit, u għandu jkun ≥ 1,6 qabel ma tkun meħtieġa evalwazzjoni ulterjuri tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-ġilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu tal-kejl tal-kontenut tal-BrdU biex

▼M3

jindika għadd miżjud ta' ċelloli proliferanti fin-noduli tal-limfa awrikolari li jsaffu. BrdU huwa analogu ta' timidina u jiġi inkorporat b'mod simili fid-DNA ta' ċelloli li jipproliferaw. L-inkorporazzjoni tal-BrdU titkejjel b'ELISA, li tuża antikorp speċifiku għall-BrdU li huwa ttikkettat ukoll b'perossidaži. Meta jiżdied is-substrat, il-perossidaži jirreaġġixxi mas-substrat biex jipproduċi prodott ikkulurit li jiġi kwantifikat b'assorbenza speċifika permezz ta' qarrej tal-plakka f'livell ta' microtitre.

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

7. Il-ġurdien huwa l-ispeċi tal-għażla għal dan it-test. Studji ta' validazzjoni għal-BrdU-ELISA twettqu esklussivament bir-razza CBA/JN li għal-daqstant hija kkunsidrata r-razza ppreferuta (10) (12). Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħar, li huma nulliparuži u mhumiex tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 ġimgħat u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA: BrdU-ELISA.

Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (16), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 %, għajr waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-tħejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u miżmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas ħamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel il-bidu tat-trattament, l-annimali kollha jiġu eżaminati sabiex ikun żgurat li huma ma jkollhom l-ebda feriti osservabbli fuq il-ġilda.

It-tħejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospiżi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati waħedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżaġerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitħejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiži billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduċibbli bħala sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inklużjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex dan juri l-kompetenza tal-laboratorju biex iwettaq b'suċċess kull analiži u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Xi awtoritajiet regolatorji jeħtieġu wkoll PC għal kull studju u għaldaqstant, l-utenti huma mħeġġa jikkonsultaw mal-awtoritajiet rilevanti qabel iwettqu l-LLNA: BrdU-ELISA: Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-ħtieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu tali rekwiżiti li jistgħu jinħolqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandu jipproduċi rispons pożittiv

▼**M3**

tal-LLNA: BrdU-ELISA f'livell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 1,6 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni hija riproduċibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 14 ikun jitqies eċċessiv). PC ippreferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Numru tal-CAS 101-86-0) u 25 % ewġenol (numru tal-CAS 97-53-0) fl-aċetun:żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minħabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Filwaqt li l-inklużjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA: BrdU-ELISA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA: BrdU-ELISA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storika stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproduċibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA: BrdU-ELISA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC mill-inqas f'10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena waħda).

13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluż meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA: BrdU-ELISA (eż. bidla fil-persunal imħarreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reaġenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom jiġu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-ħtieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.

14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess ħin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati ta' studju negattivi ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perjodiku aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodiku mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubbjuži. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom jiġu kkunsidrati b'attenzjoni meta jkun deċiż jekk għandhomx ikunu inklużi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (17).

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat fil-mezz li huwa magħruf li jqanqal reazzjoni konsistenti (eż. aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom l-ittestjar f'mezz mhux standard (formulazzjoni rilevanti klinikament/kimikament) ikun meħtieġ ukoll (18). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanja.

▼M3

16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex isib il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

— xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,

— karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,

— dejta ta' appoġġ mil-LLNA: BrdU-ELISA,

— dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli tad-doża

17. Għal kull grupp ta' doża għandhom jintużaw tal-inqas erba' annimali, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u grupp ta' PC (simultanju jew reċenti, ibbażat fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dożi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wieħed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Apparti fin-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom jiġu ġestiti u ttrattati b'mod identiku għall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi 2 u 19. Dożi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżiko-kimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (19)(20 u Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformammid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (6) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet, jista' jkun meħtieġ li jsir użu minn solvent kimikament rilevanti jew mill-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test hija kkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi idrofiliċi tat-test ikunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jħollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi għal kollox likwidi għandhom jiġu evitati.

▼M3

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara paragrafu 33). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tinġabar dejta dwar annimali individwali (17). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Ġbir regolari ta' dejta dwar annimali individwali jipprovdi vantaġġ mil-lat tal-benesseri tal-annimal billi jevita ttestjar doppju li jkun meħtieġ li kieku r-riżultati tas-sustanza tat-test li tkun inġabret oriġinarjament b'xi mod (eż. permezz ta' dejta miġbura dwar l-annimali) kellhom jiġu kkunsidrati aktar tard mill-awtoritajiet regolatorji ma' rekwiżiti oħrajn (eż. dejta individwali dwar l-annimali).

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun stabbilita l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara paragrafu 18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi definit il-livell ta' doża xierqa li għandha tiġi ttestjata fl-LLNA: BrdU-ELISA. L-għan tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell tad-doża massima għall-użu fl-istudju tal-LLNA:BrdU-ELISA prinċipali, fejn informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li twassal għal tossiċità sistemika (ara paragrafu 24) u/jew għal irritazzjoni eċċessiva lokali tal-ġilda (ara paragrafu 23) mhijiex disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun konċentrazzjoni ta' 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir taħt l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA: BrdU-ELISA, ħlief għall-fatt li ma hemmx valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wieħed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 6). Iż-żewġ widniet ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (20, u Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Jittieħed il-kejl tal-ħxuna tal-widna permezz ta' gejġ ta' ħxuna (eż. mikrometru diġitali jew gejġ tal-ħxuna Peacock Dial) fl-ewwel Jum (qabel id-doża), fit-tielet Jum (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), u fis-sitt Jum. Barra minn hekk, fis-sitt Jum, il-ħxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥ 3 u/jew ħxuna tal-widna ta' ≥ 25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (21) (22). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA: BrdU-ELISA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-Eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2

▼M3

Osservazzjoni	Punteġġ
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (ħmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra żieda ta' 25 % fil-ħxuna tal-widna (21) (22), intużat ukoll żieda statistikament sinifikanti fil-ħxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Madankollu, għalkemm jistgħu jseħħu żidiet statistikament sinifikanti meta l-ħxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (30) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA: BrdU-ELISA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, rogħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispneja, nifs maqtugħ, u ħsejjes mill-pulmun (rales), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġigħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' > 5 % fil-piż tal-ġisem minn Jum 1 sa Jum 6 u mortalità, għandhom jiġu kkunsidrati fl-evalwazzjoni. Annimali moribondi jew annimali li juru sinjali ta' uġigħ jew dieqa severa għandhom jinqatlu b'mod uman (31).

Skeda ta' sperimentazzjoni tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda sperimentali tal-analiżi hija kif ġej:

— *Jum 1:* Identifika individwalment u ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz waħdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15), fuq in-naħa ta' wara ta' kull widna.

— *Jiem 2 u 3:* Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni li għamilt f'Jum 1.

— *Jum 4:* L-ebda trattament.

— *Jum 5:* Injetta 0,5 mL (5 mg/ġurdien) ta' soluzzjoni BrdU (10 mg/mL) ġewwa l-peritonju.

— *Jum 6:* Ħu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Madwar 24 siegħa (24h) wara l-injezzjoni tal-BrdU, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' barra n-nodi limfatiċi awrikulari li jkunu qed inixxu minn kull widna tal-ġurdien u pproċessa separatament f'ilma bil-melħ ibbaferjat bil-fosfat (PBS) għal kull annimal. Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (17). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-għoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksuba kemm permezz ta' gejġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

▼M3

It-tħejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Minn kull ġurdien, titħejja sospensjoni ta' ċellola waħdanija ta' ċelloli tan-nodi limfatiċi (LNC — lymph node cells) maqtugħin bilateralment b'diżaggregazzjoni mekkanika ħafifa permezz ta' xibka tal-istainless steel b'malja ta' 200 micron jew permezz ta' teknika aċċettabbli oħra għall-ġenerazzjoni ta' sospensjoni ta' ċellola waħda (eż. użu ta' pestle tal-plastik li tintrema wara l-użu sabiex jitfarrku n-nodi limfatiċi segwit minn mogħdija minn malja tan-najlon ta' #70). Il-proċedura għat-tħejjija tas-sospensjoni LNC hija kritika f'din l-analiżi u għaldaqstant, kull operatur għandu jistabbilixxi l-ħila bil-quddiem. Barra minn hekk, in-nodi limfatiċi f'annimali NC huma żgħar, għalhekk operazzjoni attenta hija importanti sabiex ikun evitat kwalunkwe effett artifiċjali fuq il-valuri SI. F'kull każ, il-volum fil-mira tas-sospensjoni LNC għandu jiġi aġġustat sa volum ottimizzat determinat (bejn wieħed u ieħor 15 mL). Il-volum ottimizzat huwa bbażat fuq l-ilħiq ta' assorbenza medja tal-grupp NC fi ħdan 0,1–0,2.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni ċellolari (kejl tal-kontenut tal-BrdU fid-DNA ta' limfoċiti)

27. Il-BrdU titkejjel b'ELISA permezz ta' kit kummerċjali (*eż.* Roche Applied Science, Mannheim, Ġermanja, Numru tal-Katalgu 11 647 229 001). Fil-qosor, 100 µL tas-sospensjoni tal-LNC tiżdied mal-bjar ta' mikroplatt b'qiegħ ċatt fi triplikat. Wara fissazzjoni u denaturazzjoni tal-LNC, l-antikorp kontra l-BrdU jiżdied ma' kull bir u jitħalla jirreaġġixxi. Sussegwentement, l-antikorp kontra l-BrdU jitneħħa bil-ħasil u mbagħad, is-soluzzjoni tas-substrat tiżdied u titħalla tipproduċi kromoġen. Imbagħad titkejjel l-assorbenza ta' 370 nm b'wavelength ta' referenza ta' 492 nm. Fil-każijiet kollha, il-kundizzjonijiet tat-test tal-analiżi għandhom jiġu ottimizzati (ara paragrafu 26).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

28. Kull ġurdien għandu jiġi osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjani ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (31).

Piżijiet tal-ġisem

29. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-piżijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

30. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI medja. L-SI jinkiseb billi wieħed jiddividi l-indiċi medju ta' ttikkettar tal-BrdU/ġurdien f'kull grupp tas-sustanza tat-test u l-grupp tal-PC, bl-indiċi medju ta' ttikkettar tal-BrdU għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed.

L-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU huwa definit bħala:

$$\text{Indiċi tat-tikkettar tal-BrdU} = (ABS_{em} - \text{ABS vojt}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS vojt}_{ref})$$

Fejn; em = wavelength tal-emissjoni; u ref = wavelength ta' referenza.

▼M3

31. Il-proċess tad-deċiżjoni jqis riżultat bħala pożittiv meta SI ≥ 1,6 (10). Madankollu, il-qawwa tar-relazzjoni tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wieħed jiddetermina jekk riżultat marġinali (jiġifieri valur SI bejn 1,6 u 1,9) jiġix iddikjarat pożittiv (3) (6) (32).

32. Għal rispons pożittiv marġinali bejn SI ta' 1,6 u 1,9, l-utenti jistgħu jkunu jridu jikkunsidraw informazzjoni addizzjonali bħar-relazzjoni doża-reazzjoni, evidenza ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni eċċessiva, u fejn xieraq, sinifikat statistiku flimkien ma' valuri SI sabiex jiġi kkonfermat li tali riżultati huma pożittivi (10). Għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li joħolqu sensititizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tad-doża-reazzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall x'imkien ieħor f'dan id-dokument (4).

33. Il-ġbir ta' dejta fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti li ssir analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull valutazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari kontra tqabbil ta' kontroll ta' solvent simultanju/VC simultanji). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-valutazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħżel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ, ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi b'ċerti punti ta' dejta jew mingħajrhom (li xi drabi jissejħu "anomaliji" (outliers)).

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

34. Id-dejta għandha tingħata fil-qosor f'għamla ta' tabella li turi l-valuri tal-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU tal-annimal individwali, l-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU medju tal-grupp/annimal, it-terminu ta' żball assoċjat tiegħu (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mas-solvent/grupp ta' kontroll tal-mezz simultanju.

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanzi kimiċi tat-test u ta' kontroll

— dejta tal-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott),

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, stabbiltà, solubilità),

— jekk taħlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti,

Solvent/mezz

— dejta tal-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat);

— raġuni għall-għażla tal-mezz,

▼M3

Annimali tat-test

— is-sors tal-ġrieden tas-CBA,

— l-istatus mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf,

— l-għadd u l-età tal-annimali,

— is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.,

Kondizzjonijiet tat-test

— is-sors, in-numru tal-lott u assigurazzjoni tal-kwalità tal-manifattur/dejta ta' kontroll tal-kwalità (sensittività tal-antikorp u speċifiċità u l-limitu ta' kxif) għall-kit tal-ELISA,

— dettalji dwar it-tħejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,

— raġuni għall-għażla tad-doża (inkluži riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),

— il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikata,

— dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),

— dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-teħid ta' kampjuni,

— metodi ta' kejl tat-tossiċità,

— kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi,

— dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju,

Verifika tal-affidabilità

— sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użati,

— PC simultanju u/jew storiku u dwar dejta ta' kontroll negattiv simultanju (solvent/mezz) għal-laboratorju li qed jagħmel it-test,

— jekk ma kienx hemm inkluż PC simultanju, id-dejta u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodiku reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta storika tal-PC għal-laboratorju li tiġġustifika l-bażi għaliex ma sarx PC simultanju,

Ir-riżultati

— piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla b'mod uman skedata; kif ukoll il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,

— il-ħin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal,

— tabella tal-valuri tal-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU u tal-valuri SI tal-ġurdien individwali għal kull grupp ta' trattament,

— terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal indiċi tat-tikkettar tal-BrdU/ġurdien għal kull grupp tat-trattament u r-riżultati tal-analiżi ta' barra għal kull grupp ta' trattament,

▼M3

— l-SI kkalkulat u kejl xieraq tal-varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,

— analiżijiet statistiċi, fejn xieraq,

Diskussjoni tar-riżultati

— kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Linja Gwida tat-Test Nru 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. u Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999–1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. u Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985–997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. u Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327–33.

(5) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employement of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49–59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponibbli fuq: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258–273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274–286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249–257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication Nru 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. u Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129–134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Linja Gwida tat-Test Nru 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. u Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. u Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90–96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7 edizzjoni. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit:[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13–31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Linja Gwida tat-Test Nru 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. u DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. u Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. u Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83–94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. u Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245–256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. u Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. u Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60–68.

(28) Vohr, H.W. u Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. u Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit:[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment Nru 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563–79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment Nru 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (33).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin: (i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala negattiv jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva (33).

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata ħażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva (33).

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor: Kejl ta' kemm il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanza tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor hija determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm it-test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà bejn laboratorji (33).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi ħdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirrepplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjaħ ukoll riproduċibbiltà fi ħdan il-laboratorju (33).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħrajn f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li permezz tiegħu huma vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Affidabilità: Miżuri li bihom, metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, meta jwettqu l-istess protokoll. Din hija vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi ħdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (33).

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allerġen kimiku ta' induzzjoni, li jipprovoka reazzjoni immuni fil-ġilda li tista' twassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jivvaluta l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dak fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

▼M4

B.52. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA – METODU TA' KLASSI AKUTA TOSSIKA

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 436 (2009) tal-OECD. L-ewwel TG 403 dwar inalazzjoni akuta kienet adottata fl-1981, u minn dak iż-żmien 'l hawn kienet irriveduta (ara l-kapitolu B.2 ta' dan l-Anness (1)). Żvilupp ta' metodu ta' Klassi ta' Inalazzjoni Akuta Tossika (ATC) (2) (3) (4) tqies li kien xieraq wara l-adozzjoni tal-metodu ta' ATC orali rivedut (il-kapitolu B.1 tris ta' dan l-Anness) (5). Valutazzjoni retrospettiva tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar ta' ATC għal tossiċità ta' inalazzjoni akuta wera li l-metodu kien tajjeb biex jintuża għal finijiet ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar (6). Il-Metodu ta' Ttestjar ta' ATC ta' inalazzjoni jippermetti l-użu ta' stadji wieħed wara ieħor ta' konċentrazzjonijiet immirati fissi biex tkun ipprovduta gradazzjoni ta' tossiċità tal-kimika għall-ittestjar. Il-letalità tintuża bħala punt ta' tmiem ewlieni, iżda annimali f'uġigħ sever jew f'diffikultà, fi tbatija jew f'mewta imminenti għandhom jinqatlu b'mod uman biex titnaqqas it-tbatija. Gwida dwar il-Punti tat-Tmiem b'Mod Uman huwa disponibbli fid-Dokument ta' Gwida Nru 19 tal-OECD (7).

2. Gwida dwar kif isir dan il-Metodu ta' Ttestjar jew l-interpretazzjoni tiegħu tinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 39 dwar Ittestjar tat-Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta (GD 39) (8).

3. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar huma pprovduti fl-Appendiċi 1 u f'GD 39 (8).

4. Il-Metodu ta' Ttestjar jipprovdi informazzjoni dwar il-proprjetajiet perikoluži u jippermetti li l-kimika għall-ittestjar tiġi ggradata u kklassifikata skont ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, ta' kimiċi li jikkawżaw tossiċità akuta (9). F'każ li jkunu meħtieġa stimi ta' punti ta' valuri LC_{50} jew analiżi ta' konċentrazzjoni-rispons, il-kapitolu B.2 ta' dan l-Anness (1) huwa l-Metodu ta' Ttestjar adattat li għandu jintuża. Gwida ulterjuri dwar għażla ta' Metodu ta' Ttestjar tinsab f'GD 39 (8). Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux maħsub l-aktar għall-ittestjar ta' materjali speċjalizzati, bħal materjali iżometriċi jew fibruži li ftit jinħallu jew nanomaterjali manifatturati.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

5. Qabel ma jitqies l-ittestjar skont dan il-Metodu ta' Ttestjar, l-informazzjoni kollha disponibbli dwar il-kimika għall-ittestjar, inklużi studji eżistenti li d-dejta tagħhom issostni li ma jsirx ittestjar addizzjonali, għandhom jitqiesu mil-laboratorju tal-ittestjar biex l-użu tal-annimali jkun mill-anqas. L-informazzjoni li tista' tassisti fl-għażla tal-ispeċi, razza, sess, mod ta' espożizzjoni u konċentrazzjonijiet ta' testijiet l-aktar adatti tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipat(i) u potenzjal għal espożizzjoni umana; dejta (Q)SAR disponibbli u dejta tossikoloġika dwar kimiċi relatati strutturalment. Konċentrazzjonijiet li jkunu mistennija jikkawżaw uġigħ u diffikultà severi, minħabba azzjonijiet korruživi ([1]) jew irritanti b'mod sever, m'għandhomx ikunu ttestjati b'dan il-Metodu ta' Ttestjar [ara GD 39 (8)].

([1]) L-evalwazzjoni tal-korružività tista' tkun ibbażata fuq ġudizzju espert billi tintuża evidenza bħal: esperjenza tal-bnedmin u tal-annimali, dejta eżistenti (in vitro), eż. il-kapitolu B.40 (10), B.40 bis (11) ta' dan l-anness jew TG 435 tal-OECD (12), valuri ta' pH, informazzjoni minn kimiċi simili jew dejta pertinenti oħra.

▼M4

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Huwa l-prinċipju tat-test li abbaži ta' proċedura pass pass, tinkiseb informazzjoni suffiċjenti dwar it-tossiċità ta' inalazzjoni akuta tal-kimika għall-ittestjar matul perjodu ta' espożizzzjoni ta' 4 sigħat biex tkun tista' ssir klassifikazzjoni. Jistgħu japplikaw durati oħra ta' espożizzjoni biex jaqdu għanijiet regolatorji speċifiċi. F'kull wieħed mill-istadji definiti ta' konċentrazzjoni, ikunu ttestjati 3 annimali taż-żewġ sessi. Skont il-mortalità u/jew l-istat moribond tal-annimali, 2 stadji jistgħu jkunu suffiċjenti biex jitħalla jsir ġudizzju dwar it-tossiċità akuta tal-kimika għall-ittestjar. Jekk tkun ipprovduta evidenza li sess wieħed ikun aktar suxxettibbli mill-ieħor, fil-każ it-test jista' jitkompla mas-sess l-aktar suxxettibbli biss. Ir-riżultat tal-istadju ta' qabel għandu jiddetermina l-istadju li jkun imiss b'dan li:

(a) Ma jkunx meħtieġ ittestjar aktar,

(b) Ittestjar ta' tliet annimali għal kull sess, jew

(c) Ittestjar b'6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli biss, jiġifieri l-istimi tal-limiti aktar baxxi tal-klassi tossika għandhom ikunu bbażati fuq 6 annimali għal kull grupp ta' test ta' konċentrazzjoni, irrispettivament mis-sess.

7. L-annimali moribondi jew annimali li jkunu jidhru li jkunu muġugħa jew li juru sinjali ta' diffikultà severa u li ttul għandhom jinqatlu b'mod uman, u jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bl-istess mod bħall-annimali li jkunu mietu fit-test. Kriterji għat-teħid tad-deċiżjoni li jinqatlu annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu ħafna, u gwida biex ikun magħruf meta l-mewt tkun tista' titbassar jew tkun waslet qrib ħafna, huma s-suġġett tad-Dokument ta' Gwida Nru 19 dwar Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (7).

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimali

8. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażagħ f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi ppreferuta hija l-far u għandhom ikunu pprovduti ġustifikazzjonijiet jekk jintużaw speċijiet oħra.

Preparazzjoni tal-annimali

9. Nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal. Fil-jum ta' espożizzjoni, annimali għandhom ikunu adulti żgħażagħ ta' 8 sa 12-il ġimgħa fl-età, u l-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' ±20 % tal-piż medju għal kull sess ta' kull annimal espost qabel tal-istess età. L-annimali jintgħażlu b'mod każwali, jiġu mmarkati għal identifikazzjoni individwali. L-annimali jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għal mill-anqas 5 ijiem qabel ma jibda t-test biex jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. L-annimali għandhom ukoll ikunu akklimatizzati għall-apparat tat-test għal perjodu qasir qabel l-ittestjar, minħabba li dan inaqqas it-tensjoni kkawżata bl-introduzzjoni għall-ambjent il-ġdid.

Trobbija tal-annimali

10. It-temperatura tal-kamra taż-żamma tal-annimali tal-esperimeti għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqiegħdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-għadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull annimal u għandu jimminimizza t-telf minħabba kannibaliżmu u ġlied. Meta annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieħer biss, jista' jkun jeħtiġilhom jidraw it-tubi ta' trażżin. It-tubi ta' trażżin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusklu. Jekk dejta ġenerika tkun

▼M4

disponibbli li turi li ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa ċertu limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx meħtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trażżin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jitħallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' sħabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, ħlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

Kmamar tal-inalazzjoni

11. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-għan tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-mod preferut ta' espożizzjoni huwa mill-imnieħer biss (liema fraži tinkludi r-ras biss, l-imnieħer biss jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieħer biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu aħjar billi tintuża modalità ta' espożizzjoni mill-ġisem kollu, iżda dan għandu jkun iġġustifikat fir-rapport tal-istudju. Biex tkun żgurata stabbiltà tal-atmosfera meta tintuża kamra għall-ġisem kollu, il-volum totali tal-annimali tat-test m'għandux ikun aktar minn 5 % tal-volum tal-kamra. Prinċipji ta' tekniki ta' espożizzjoni mill-imnieħer biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma deskritti f'GD 39 (8).

KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Amministrazzjonijiet ta' konċentrazzjonijiet

12. Huwa rrakkomandat li espożizzjoni ddum erba' sigħat fissi, eskluż ħin ta' ekwilibrazzjoni. Jistgħu jkunu meħtieġa espożizzjonijiet li jdumu aktar biex jitħarsu rekwiżiti speċifiċi, iżda, għandha tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta' studju [ara GD 39 (8)]. L-annimali esposti fi kmamar għall-ġisem kollu għandhom jingħalqu individwalment biex ma jitħallewx jibilgħu kimika għall-ittestjar minħabba tindif ta' sħabhom fil-gaġġa. M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzzjoni. Jista' jingħata ilma matul espożizzjoni kollha mill-ġisem kollu.

13. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew taħlita tagħhom. L-istat fiżiku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fiżika li x'aktarx tkun preżenti matul l-immaniġġar u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet esplussivi.

Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli

14. It-teħid tad-daqs tal-partiċelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex jitħalla jkun hemm espożizzjoni tar-reġjuni kollha rilevanti tas-sistema respiratorja, huma rrakkomandati aerosols b'dijametri ajrudinamiċi ta' medja massa (MMAD) f'firxa minn 1 sa 4 μm b'devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g) fil-firxa ta' 1,5 sa 3,0 (8) (13) (14). Għalkemm għandu jsir sforz raġonevoli biex dan l-istandard jintlaħaq, għandu jingħata ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, dħaħen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u partiċelli, fibri u materjali igroskopiċi mimlijin (li jikbru fid-daqs fl-ambjent niedi tas-sistema respiratorja) jistgħu jaqbżu dan l-istandard.

▼M4

Preparazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'vejjikolu

15. Jista' jintuża vejjikolu biex jiġġenera konċentrazzjoni u daqs ta' partiċelli xierqa tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera. Bħala regola, l-ilma għandu jingħata preferenza. Materjal ta' partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex tinkiseb id-distribuzzjoni ta' daqs meħtieġ ta' partiċelli, iżda għandha tingħata attenzjoni li ma titħassarx jew tinbidel il-kimika għall-ittestjar. F'każijiet fejn proċessi mekkaniċi jitqiesu li jkunu bidlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar (eż. temperatura estrema minn ħin eċċessiv minħabba frizzjoni), il-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun ivverifikata b'mod analitiku. Għandha tingħata attenzjoni adegwata biex il-kimika għall-ittestjar ma tkunx ikkontaminata. Ma jkunx meħtieġ li jkunu ttestjati materjali mrammla mhux nutrittivi li jkunu fformulati apposta biex ma jkunux jistgħu jittieħdu man-nifs. Għandu jintuża test ta' attrizzjoni biex jintwera li partiċelli li jistgħu jittieħdu man-nifs ma jkunux prodotti meta jkun itrattat materjal granulari. Jekk test ta' attrizzjoni jipproduċi partiċelli li jkunu jistgħu jittieħdu man-nifs, għandu jsir test għat-tossiċità li tittieħed man-nifs.

Annimali tal-kontroll

16. Ma jkunx meħtieġ grupp ta' kontroll konkurrenti negattiv (arja). Meta vejjikolu, minbarra ilma, jintuża biex jassisti biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test, grupp ta' kontroll ta' vejjikoli għandu jintuża biss meta dejta storika ta' teħid ta' tossiċità man-nifs ma tkunx disponibbli. Jekk studju dwar tossiċità ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma juri ebda tossiċità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata; għalhekk ma jkunx meħtieġ kontroll ta' vejjikolu.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJIET TA' ESPOŻIZZJONI

Fluss tal-arja fil-kamra

17. Il-fluss ta' arja mal-kamra għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u rreġistrat mill-anqas kull siegħa matul kull espożizzjoni. Il-monitoraġġ ta' konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdi mezzi indiretti għall-kontroll tal-parametri dinamiċi rilevanti kollha ta' ġenerazzjoni ta' atmosfera. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex tkun evitata inalazzjoni mill-ġdid fi kmamar għall-imnieħer biss f'każijiet fejn fluss tal-arja mis-sistema ta' espożizzjoni ma jkunx adegwat biex jipprovdi fluss dinamiku ta' atmosfera tal-kimika għall-ittestjar. Hemm metodoloġiji preskritti li jistgħu jintużaw biex jintwera li inalazzjoni mill-ġdid ma ssirx skont il-kundizzjonijiet operattivi magħżula (8) (15). Konċentrazzjoni ta' ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u konċentrazzjoni ta' dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wieħed jemmen li dawn l-istandards ma jkunux jistgħu jintlaħqu, konċentrazzjonijiet ta' ossiġenu u ta' dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu.

Temperatura tal-kamra u umdità relattiva

18. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm għall-22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieħer biss, kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata u rreġistrata mill-anqas tliet darbiet għal perjodi ta' sa 4 sigħat, u kull siegħa għal perjodi aqsar. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati taħlitiet ibbażati fl-ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minħabba interferenza minn kimika għall-ittestjar mal-metodu tal-ittestjar.

▼M4

Kimika għall-ittestjar: konċentrazzjoni nominali

19. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominal tal-kamra ta' espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda tintuża bħala paragun tal-konċentrazzjoni nominali, u l-konċentrazzjoni attwali tagħti indikazzjoni tal-effiċjenza ta' ġenerazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, tista' tintuża biex jinkixfu problemi ta' ġenerazzjoni.

Kimika għall-ittestjar: konċentrazzjoni attwali

20. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fiż-żona fejn l-annimali jieħdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu jew b'metodi speċifiċi (eż. teħid dirett ta' kampjuni, metodi ta' assorbiment jew kimiċi reattivi u karatterizzazzjoni analitika sussegwenti) jew b'metodi mhux speċifiċi bħal analiżi gravimetrika b'filtru. L-użu ta' analiżi gravimetrika huwa aċċettabbli biss għal aerosols tat-trab b'komponent wieħed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilità baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għall-kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'ħafna komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analiżi gravimetrika. Iżda din teħtieġ dejta analitika li turi li l-kompożizzjoni ta' materjal tal-ajru tkun simili għall-materjal tal-bidu. Jekk din l-informazzjoni ma tkunx disponibbli, tista' tkun meħtieġa analiżi mill-ġdid tal-kimika għall-ittestjar (idealment fl-istat tagħha fl-arja) f'intervalli regolari waqt li jkun għaddej l-istudju. Għal aġenti aerosolizzati li jistgħu jevaporaw jew jissubblimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu nġabru bil-metodu magħżul. Il-konċentrazzjonijiet immirati, nominali u attwali għandhom ikunu pprovduti fir-rapport tal-istudju, iżda konċentrazzjonijiet attwali biss jintużaw fl-analiżi ta' statistika biex ikunu kkalkulati valuri ta' konċentrazzjonijiet letali.

21. Għandu jintuża lott wieħed tal-kimika għall-ittestjar, jekk ikun possibbli, u l-kampjun tat-test għandu jinħażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-purezza, l-omoġeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbeda l-istudju, għandu jkun hemm karatterizzazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkluża l-purezza tagħha, u jekk teknikament fattibbli, l-identità u l-kwantitajiet ta' kontaminanti u impuritajiet identifikati. Dan jista' jintwera bid-dejta li ġejja, iżda ma jkunx limitat għaliha: ħin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimi oħra. Għalkemm l-identità tal-kampjun tat-test mhix ir-responsabbiltà tal-laboratorju tat-test, ikun prudenti għal-laboratorju tat-test li jikkonferma l-karatterizzazzjoni tal-isponser mill-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

22. L-atmosfera ta' espożizzjoni għandha tinżamm kemm prattikabbilment kostanti u tkun immonitorjata kontinwament u/jew kull tant skont il-metodu ta' analiżi. Meta jintuża t-teħid ta' kampjuni kull tant, għandhom jittieħdu kampjuni tal-atmosfera tal-kamra mill-anqas darbtejn għal studju ta' erba' sigħat. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minħabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew konċentrazzjonijiet baxxi, ikun jista' jinġabar kampjun wieħed tul il-perjodu kollu ta' espożizzzjoni. Jekk iseħħ ċaqliq minn kampjun għal kampjun, il-konċentrazzjonijiet ittestjati li jkun imiss għandhom jużaw erba' kampjuni għal kull espożizzjoni. Kampjuni individwali tal-konċentrazzjoni tal-kamra m'għandhomx jiddevjaw mill-konċentrazzjoni medja tal-kamra b'aktar minn ± 10 % għal gassijiet u fwar, u b'mhux aktar minn ± 20 % għal aerosols likwidi jew solidi. L-ekwilibrazzjoni ta' ħin ma' kamra (t_{95}) għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-ħin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata u din tqis il-ħinijiet meħtieġa biex jinkiseb t_{95}. Gwida għal stima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (8).

▼M4

23. Għal kull taħlita kumplessa ħafna magħmula minn fwar/gassijiet u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodotti/mezzi ta' użu finali b'għan speċifiku), kull fażi tista' taġixxi b'mod differenti f'kamra tal-inalazzjoni, għalhekk għandha tintgħażel mill-anqas sustanza (analita) waħda bħala indikatur, normalment is-sustanza attiva prinċipali fit-taħlita, ta' kull fażi (fwar/gass u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun taħlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata għat-taħlita totali u mhux biss għall-ingredjent attiv jew għall-komponent (analita). Informazzjoni addizzjonali dwar konċentrazzjonijiet attwali tinsab f'GD 39 (8).

Kimika għall-ittestjar: distribuzzjoni tad-daqs ta' partiċelli

24. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas darbtejn matul kull espożizzjoni ta' 4 sigħat billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv bħall-għodda ajrudinamika li tagħti d-daqs tal-partiċelli. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza tar-riżultati miksubin minn impattur kaskata jew strument alternattiv, f'dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista' jintuża tul l-istudju kollu. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża flimkien mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-ġbir. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi tad-daqs ta' partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analiżi b'filtru [ara GD 39 (8)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-fażi bikrija tal-istudju, f'dak il-każ kejlijiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jitħallew barra. Għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri li jimminimizzaw dejta inkonklussiva li tista' twassal għal ħtieġa ta' ripetizzjoni ta' espożizzjoni. Teħid tad-daqs ta' partiċelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista' tirriżulta kondensazzjoni ta' fwar fil-formazzjoni ta' aerosol, jew jekk jinstabu partiċelli f'atmosfera ta' fwar b'potenzjal għal fażijiet imħallta (ara l-paragrafu 14).

PROĊEDURA

Test ewlieni

25. Għal kull stadju jintużaw tliet annimali għal kull sess, jew sitt annimali tas-sess aktar suxxettibbli. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra firien ikunu esposti mill-imnieħer biss, perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex titnaqqas diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Il-livell ta' konċentrazzjoni li għandu jintuża bħala d-doża tal-bidu jintgħażel minn wieħed minn erba' livelli fissi u l-livell ta' konċentrazzjoni tal-bidu għandu jkun dak li l-aktar probabbli jipproduċi tossiċità f'xi annimali dożati. L-iskemi ta' ttestjar għal gassijiet, fwar u aerosols (inklużi fl-Appendiċijiet 2-4) jirrappreżentaw l-ittestjar b'valuri ta' limitu tal-kategoriji ta' CLP 1-4 (9) għal gassijiet (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (Appendiċi 2), għal fwar (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (Appendiċi 3) u għal aerosols (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (Appendiċi 4). Il-Kategorija 5, li mhix implimentata fir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) hija relatata ma' konċentrazzjonijiet 'il fuq mill-konċentrazzjonijiet rispettivi ta' limitu. Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu tapplika l-iskema ta' ttestjar rispettiva. Skont l-għadd ta' annimali maqtula b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati sakemm tkun tista' ssir kategorizzazzjoni.

26. L-intervall ta' żmien bejn gruppi ta' espożizzjoni jkun iddeterminat malli jfaqqgħu sinjali tossiċi, kemm idumu u s-severità tagħhom. Espożizzjoni ta' annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha tittawwal sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli fis-sopravivenza tal-annimali li jkunu ġew ittestjati qabel. Perjodu ta' tlieta jew erbat ijiem bejn l-espożizzjonijiet f'kull livell ta' konċentrazzjoni huwa rrakkomandat biex titħalla ssir l-osservazzjoni ta' tossiċità mdewma. L-intervall ta' żmien jista' jkun aġġustati skont il-każ, eż. f'każ ta' risponsi inkonklusivi.

▼M4

Test ta' limitu

27. It-test ta' limitu jintuża meta l-kimika għall-ittestjar tkun magħrufa jew mistennija li tkun kważi mhux tossika, jiġifieri li tislet rispons tossiku 'l fuq biss mill-konċentrazzjoni regolatorja ta' limitu. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar tista' tinkiseb minn tagħrif dwar sustanzi ttestjati simili jew minn taħlitiet simili, billi titqies l-identità u l-perċentwali ta' komponenti magħrufin li jkunu ta' sinifikat tossikoloġiku. F'dawk is-sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ftit jew ebda informazzjoni dwar it-tossiċità tagħha, jew fejn il-kimika għall-ittestjar tkun mistennija li tkun tossika, għandu jsir it-test ewlieni [gwida ulterjuri tinsab f'GD 39 (8)].

28. Bl-użu tal-proċedura normali, tliet annimali għal kull sess, jew sitt annimali tas-sess aktar suxxettibbli, ikunu esposti f'konċentrazzjonijiet ta' 20 000 ppm għal gassijiet, 20 mg/l għal fwar u 5 mg/l għal trabijiet/raxxijiet, rispettivament (jekk ikunu jistgħu jinkisbu), li jservu bħala t-test ta' limitu għal dan il-Metodu ta' Ttestjar. Meta jkunu ttestjati aerosols, l-għan primarju għandu jkun li jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs (jiġifieri MMAD ta' 1-4 μm). Dan ikun possibbli għal kważi l-kimiċi kollha għall-ittestjar f'konċentrazzjoni ta' 2 mg/l. Ittestjar ta' aerosols f'aktar minn 2 mg/l għandu jkun ittentat biss jekk ikun jista' jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittieħed man-nifs [ara GD 39 (8)]. Skont GHS (16), ittestjar li jkun jeċċedi konċentrazzjoni limitata huwa skuraġġit għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali. Ittestjar fil-Kategorija 5 GHS (16), li mhux implimentat fir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9), għandu jitqies biss meta jkun hemm probabbiltà kbira li riżultati ta' test bħal dan ikun se jkollhom rilevanza diretta għall-protezzjoni tas-saħħa tal-bniedem, u tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta' studju. Fil-każ ta' kimiċi għall-ittestjar potenzjalment esplożivi, għandha tingħata attenzjoni biex ikunu evitati kundizzjonijiet favorevoli għal splużjoni. Biex ikun evitat l-użu mhux meħtieġ tal-annimali, għandu jsir test ta' prova mingħajr l-annimali qabel it-test ta' limitu sabiex ikun żgurat li l-kundizzjonijiet tal-kamra għat-test ta' limitu jkunu jistgħu jinkisbu.

OSSERVAZZJONIJIET

29. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament sikwit matul il-perjodu ta' espożizzzjoni. Wara espożizzjoni, osservazzjonijiet kliniċi għandhom isiru mill-anqas darbtejn fil-jum ta' espożizzjoni jew aktar sikwit meta indikat mir-rispons tal-annimali għal trattament, u mill-anqas darba kuljum minn hemm 'il quddiem għal total ta' 14-il jum. It-tul tal-perjodu ta' osservazzjoni ma jkunx iffissat, iżda għandu jkun iddeterminat min-natura u miż-żmien meta jfaqqgħu sinjali kliniċi u mit-tul tal-perjodu ta' rkupru. Id-drabi li fihom sinjali ta' tossiċità jidhru u jgħibu huma importanti, l-aktar jekk ikun hemm tendenza li sinjali ta' tossiċità jdumu ma jidhru. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati sistematikament b'reġistri individwalment miżmumin għal kull annimal. L-annimali li jinstabu li jkunu f'kondizzjoni moribonda u annimali li juru uġigħ sever u/jew sinjali li jdumu ta' diffikultà għandhom jinqatlu b'mod uman għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali. Għandha tingħata attenzjoni meta jsiru eżamijiet għal sinjali kliniċi ta' tossiċità biex meta jidhru ftit għall-bidu u jkun hemm bidliet respiratorji li jgħaddu malajr, li jiġu minn proċedura ta' espożizzjoni, wieħed ma jiħux żball u jaħsibhom effetti relatati ma' trattament. Għandhom jitqiesu l-prinċipji u l-kriterji miġburin fil-qosor fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Punti tat-Tmiem b'Mod Uman (7). Meta annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-ħin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.

▼M4

30. Osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn u l-membrani mukuži, u wkoll fis-sistema respiratorja, ċirkulatorja, awtonomika u nervuża ċentrali, u f'attività somatomotorja u xejriet ta' mġiba. Meta jkun possibbli, kull differenzjar bejn effetti lokali u sistemiċi għandu jkun innotat. Attenzjoni għandha tkun diretta għal osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulżjonijiet, tibżiq, dijarea, letarġija, rqad u koma. Il-kejl ta' temparaturi tar-rektum jista' jipprovdi evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ta' ipo/ipertermja relatati ma' trattament jew għeluq.

Piżijiet tal-ġisem

31. Il-piżijiet individwali ta' kull annimal għandhom jiġu rreġistrat darba matul l-perjodu ta' akklimatazzjoni, fil-jum ta' espożizzjoni qabel espożizzjoni (jum 0) u mill-anqas fil-jiem 1, 3 u 7 (u kull ġimgħa minn hemm 'il quddiem), u fil-ħin tal-mewt jew ewtanasja jekk jinqabeż jum 1. Il-piż tal-ġisem huwa rikonoxxut bħala indikatur kritiku ta' tossiċità, u annimali li juru tnaqqis sostnut ta' > 20 %, mqabbel ma' valuri ta' qabel l-istudju, għandhom ikunu mmonitorjati mill-qrib. L-annimali li jibqgħu ħajjin jintiżnu u jinqatlu b'mod uman fi tmiem il-perjodu ta' wara l-espożizzjoni.

Patoloġija

32. L-annimali kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jinqatlu bl-ewtanasja u jitneħħew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal awtopsja makroskopika. Jekk ma tkunx tista' ssir awtopsja minnufih wara li jkun instab annimal mejjet, l-annimal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperaturi baxxi biżżejjed biex tkun imminimizzata awtoliżi. Awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopiċi kollha għandhom jiġi rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.

33. Eżamijiet addizzjonali inklużi *a priori* dawk imfasslin apposta jistgħu jitqiesu li jestendu l-valur interpretattiv tal-istudju, bħall-kejl tal-piż tal-pulmun ta' firien li jkunu baqgħu ħajjin u/jew li jipprovdu evidenza ta' irritazzjoni b'eżami mikroskopiku tas-sistema respiratorja. Organi eżaminati jistgħu jinkludu dawk li juru evidenza ta' patoloġija makroskopika f'annimali li jibqgħu jgħixu għal 24 siegħa jew aktar, u organi magħrufin jew mistennija li jkunu affettwati. L-eżami mikroskopiku tas-sistema respiratorja kollha jista' jipprovdi informazzjoni utli dwar kimiċi għall-ittestjar li huma reattivi mal-ilma, bħal aċidi u kimiċi igroskopiċi għall-ittestjar.

DEJTA U RAPPURTAR

Dejta

34. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwali fir-rigward tal-piżijiet tal-ġisem u s-sejbiet mill-awtopsji. Dejta dwar osservazzjonijiet kliniċi għandha tinġabar fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test l-għadd ta' annimali użati, l-għadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali speċifiċi ta' tossiċità, l-għadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-ħin tal-mewt ta' kull annimal, deskrizzjoni u kemm jieħdu żmien effetti tossiċi u riversibbiltà, u sejbiet minn awtopsji.

▼M4

Rapport tat-test

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skont il-każ:

Annimali tat-test u trobbija

— Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta;

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far;

— Għadd, età u sess tal-annimali;

— Metodu ta' każwalità;

— Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma);

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test, inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard;

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza, u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża isomerizzazzjoni).

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstract Services (CAS), jekk ikunu magħrufa;

Vejjikolu

— Ġustifikazzjoni għal użu ta' vejjikolu u ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

— Dejta storika jew konkurrenti li turi li l-vejjikolu ma jfixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni tal-kamra tal-inalazzjoni inklużi d-dimensjonijiet u l-volum;

— Sors u deskrizzjoni tat-tagħmir użat għall-espożizzjoni tal-annimali kif ukoll għall-ġenerazzjoni tal-atmosfera;

— Tagħmir għall-kejl tat-temperatura, umdità, daqs tal-partiċelli u konċentrazzjoni attwali;

— Sors ta' arja, trattament ta' arja pprovduta/estratta u sistema użata għal kondizzjonament;

— Metodi użati għall-kalibrazzjoni tat-tagħmir biex tkun żgurata atmosfera omoġenea tat-test;

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva);

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieħer biss); tqegħid tal-annimali fis-sistema (ġisem kollu);

— Omoġenità/stabbiltà temporali tal-atmosfera tat-test;

— Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u teħid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;

— Rati tal-fluss tal-arja, rata tal-fluss tal-arja/port ta' espożizzjoni (imnieħer biss), jew toqol tal-annimali/kamra (il-ġisem kollu);

— Informazzjoni dwar it-tagħmir użat għall-kejl tal-ossiġenu u tad-dijossidu tal-karbonju, jekk applikabbli;

▼M4

— Ħin meħtieġ biex jintlaħaq ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t_{95});

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli);

Dejta ta' espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni;

— Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal ġol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra);

— Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-żona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal taħlitiet tat-test li jipproduċu forom fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament;

— Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (eż. mg/l, mg/m^3, eċċ.); unitajiet ta' volum (eż. ppm, ppb) jistgħu wkoll ikunu rrappurtati f'parenteżi;

— Distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli, dijametru ajrudinamiku ta' medjan tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Għandha tkun irrappurtata analiżi waħda għal kull daqs ta' partiċelli.

Kundizzjonijiet tat-test

— Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kull proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs ta' partiċelli ta' sustanzi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar. F'każijiet fejn il-proċessi mekkaniċi jkunu setgħu biddlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inkludi r-riżultati tal-analiżi li tivverifika l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar;

— Deskrizzjoni (preferibbilment inkluża dijagramma) tat-tagħmir użat biex tkun iġġenerata l-atmosfera tat-test u biex l-annimali jkunu esposti għall-atmosfera tat-test;

— Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u l-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-teħid tal-kampjuni);

— Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet tat-test;

Riżultati

— Tabulazzjoni tat-temperatura tal-kamra, l-umdità u l-fluss tal-arja;

— Tabulazzjoni tad-dejta ta' konċentrazzjoni nominali u attwali tal-kamra;

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar id-daqs ta' partiċelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs ta' partiċelli u kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g;

— Tabulazzjoni ta' dejta dwar rispons u ta' livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, u durata tal-effetti);

— Piżijiet individwali ta' kull ġisem ta' annimali miġburin f'jiem ta' studju, data u ħin tal-mewt jekk qabel l-ewtanasja skedata; kemm ikun għadda żmien meta jfaqqgħu sinjali ta' tossiċità, u jekk dawn kinitx riversibbli għal kull annimal;

▼M4

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli;

— Il-klassifikazzjoni tal-kategorija CLP u l-valur ta' limitu LC_{50};

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfażi partikolari għad-deskrizzjoni ta' metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-konċentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-partiċelli;

— Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni tal-partiċelli fid-dawl tas-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-partiċelli ma setgħux jitħarsu;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni tal-konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probbbali tal-mewt u l-modalità predominanti ta' azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati;

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm ħtieġa li b'mod uman jinqatlu annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (7).

LETTERATURA:

(1) Il-Kapitolu B.2 ta' dan l-Anness, Tossiċità Akuta (Inalazzjoni).

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Il-Kapitolu B.1 tris ta' dan l-Anness, Tossiċità Orali Akuta — Metodu tal-Klassi Akuta Tossika.

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

(10) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness: Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test ta' Reżistenza Elettrika Transkutanea (TER).

(11) Il-Kapitolu B.40 bis ta' dan l-Anness: Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test Mudell tal-Ġilda Umana.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 2

Proċedura li għandha tkun segwita minn kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-gassijiet (ppm/4h)

Rimarki ġenerali ([1])

Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu, l-iskemi rispettivi ta' ttestjar kif inklużi f'din l-Appendiċi jagħtu profil tal-proċedura li għandha tkun segwita.

Appendiċi 2a: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 100 ppm

Appendiċi 2b: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 500 ppm

Appendiċi 2c: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 2 500 ppm

Appendiċi 2d: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 20 000 ppm

Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

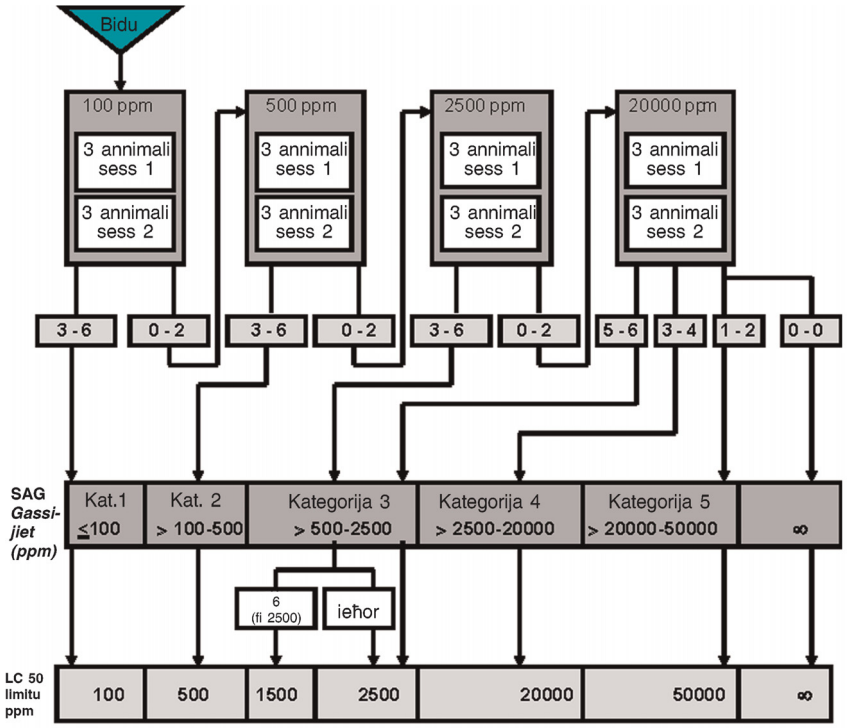
([1]) Fit-tabelli li ġejjin qed issir referenza għall-GHS (Sistema Globali Armonizata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossiċità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼M4

Appendiċi 2a

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 100 ppm/4h għall-gassijiet



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

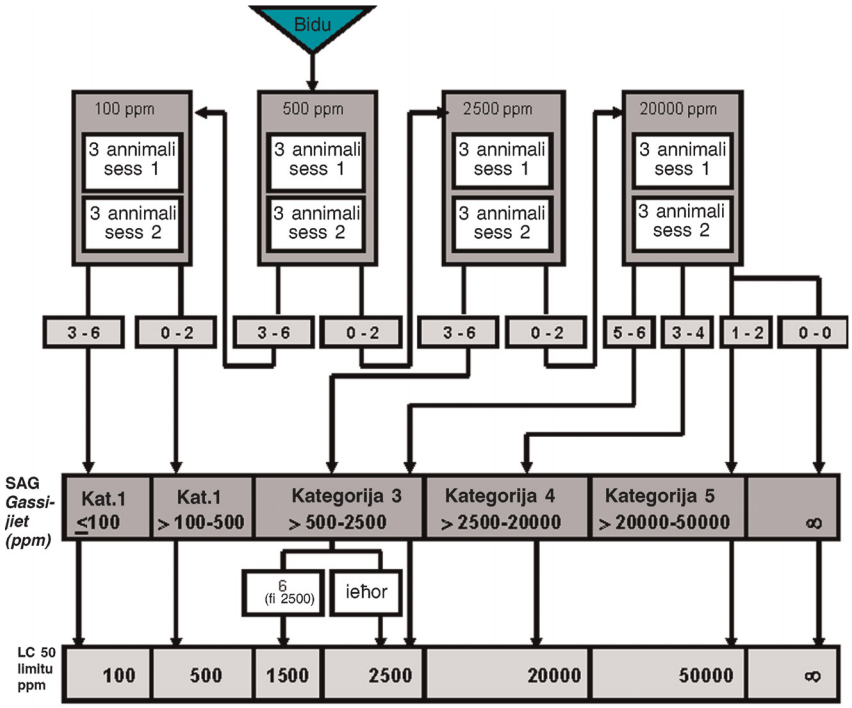
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 2b

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 500 ppm/4h għall-gassijiet



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

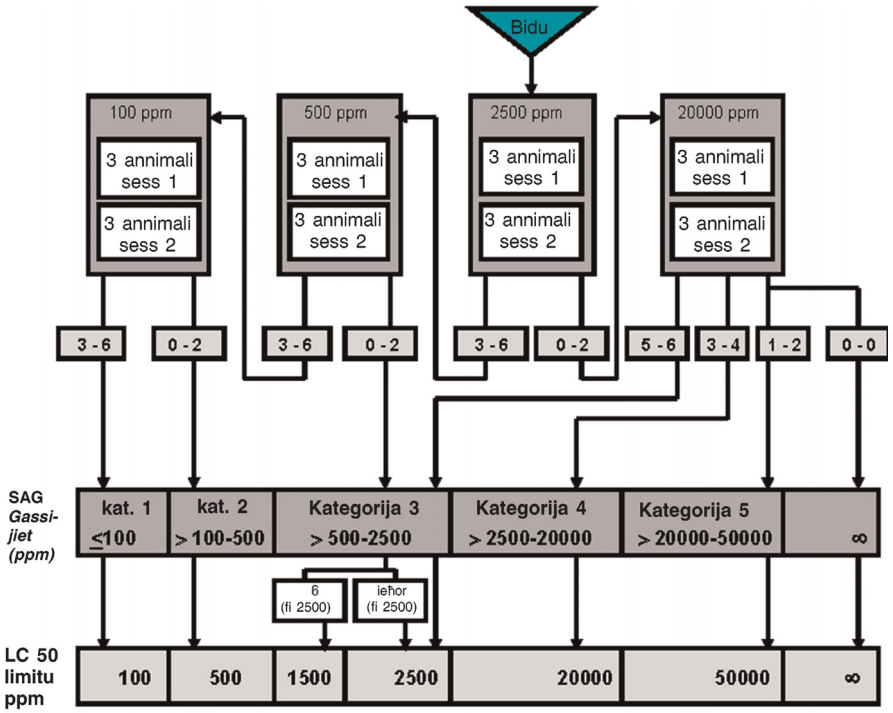
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 2c

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 2 500 ppm/4h għall-gassijiet



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0–6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

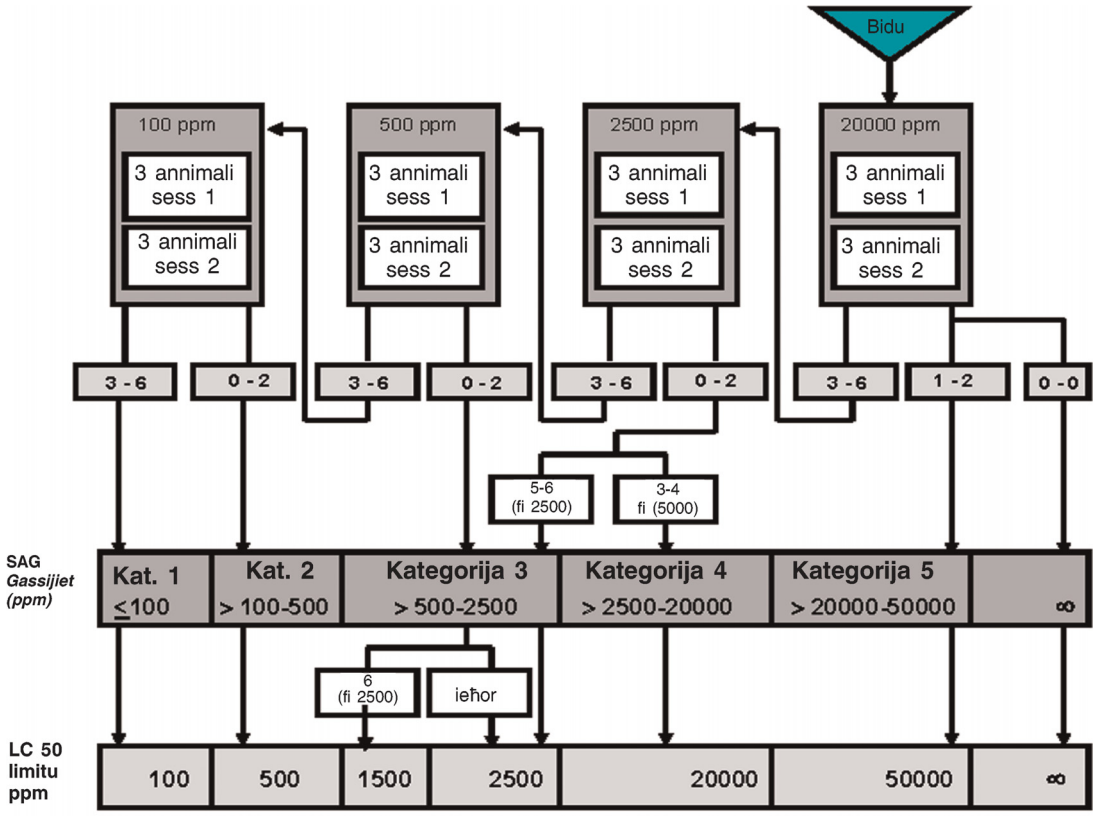
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 2d

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 20 000 ppm/4h għall-gassijiet



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 3

Proċedura li għandha tkun segwita minn kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-fwar (mg/l/4h)

Rimarki ġenerali ([1])

Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu, l-iskemi rispettivi ta' ttestjar kif inklużi f'dan l-Appendiċi jagħtu profil tal-proċedura li għandha tkun segwita.

Appendiċi 3a: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,5 mg/l

Appendiċi 3b: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 2,0 mg/l

Appendiċi 3c: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 10 mg/l

Appendiċi 3d: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 20 mg/l

Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

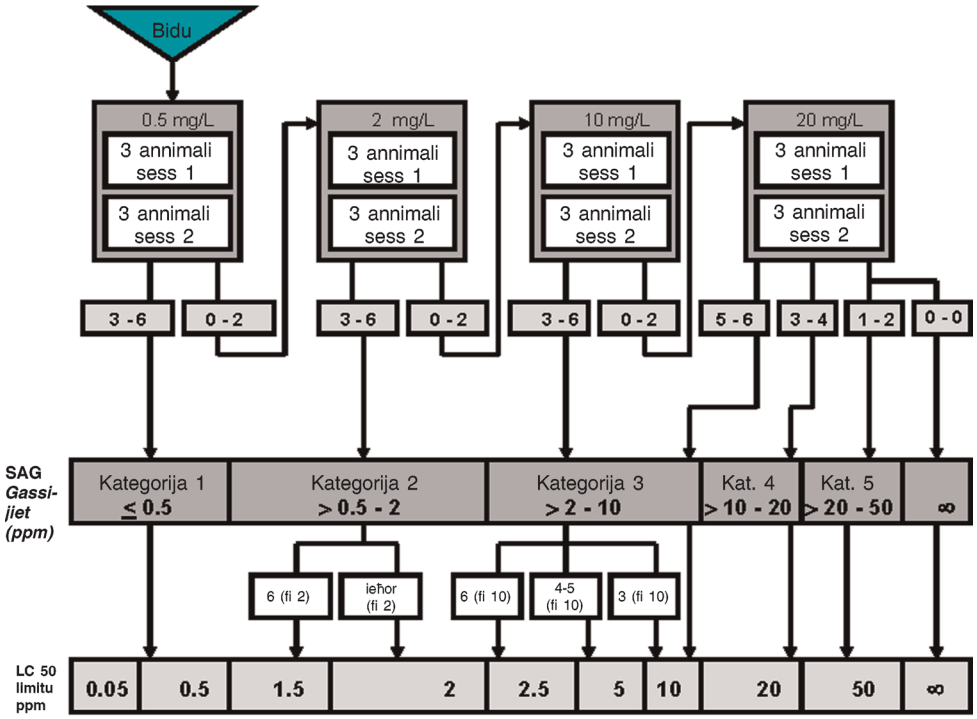
([1]) Fit-tabelli li ġejjin qed issir referenza għall-GHS (Sistema Globali Armonizata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossiċità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼M4

Appendiċi 3a

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 0,5 mg/L/4h għall-fwar



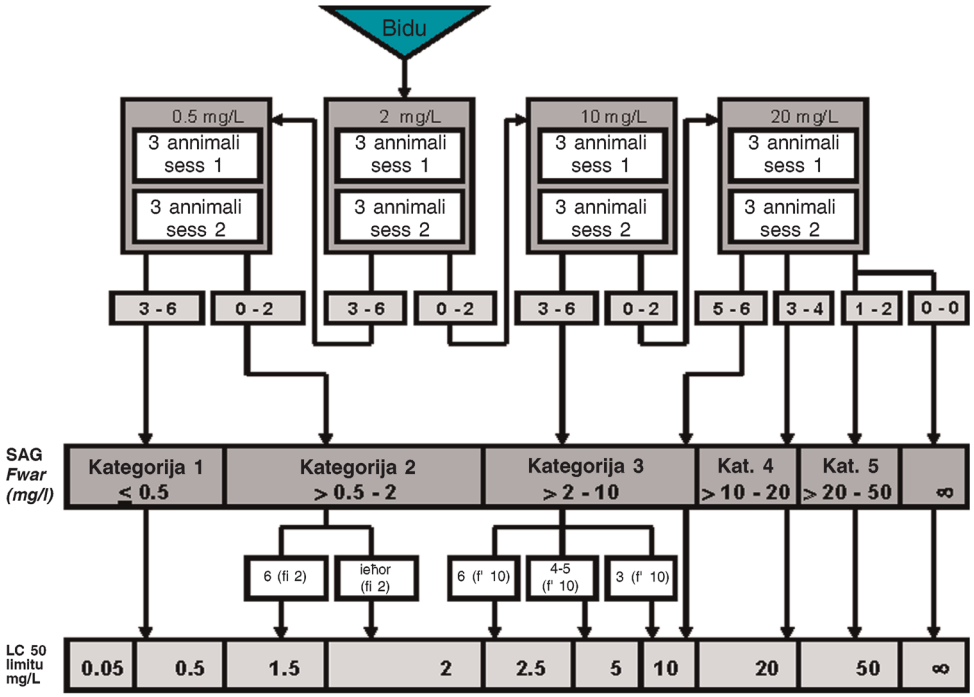
- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 3b

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 2 mg/L/4h għall-fwar



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0–6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

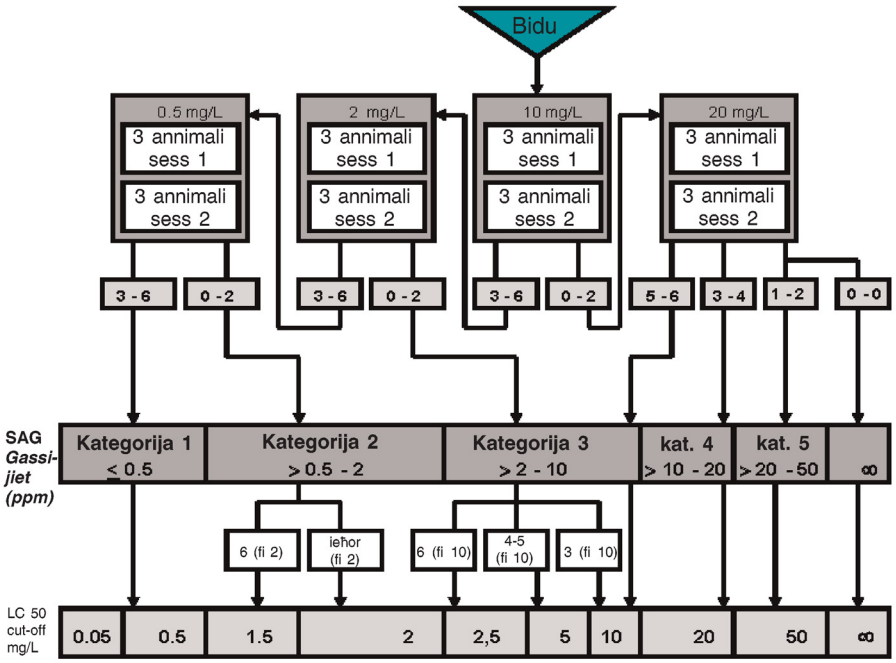
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 3c

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 10 mg/L/4h għall-fwar



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0–6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

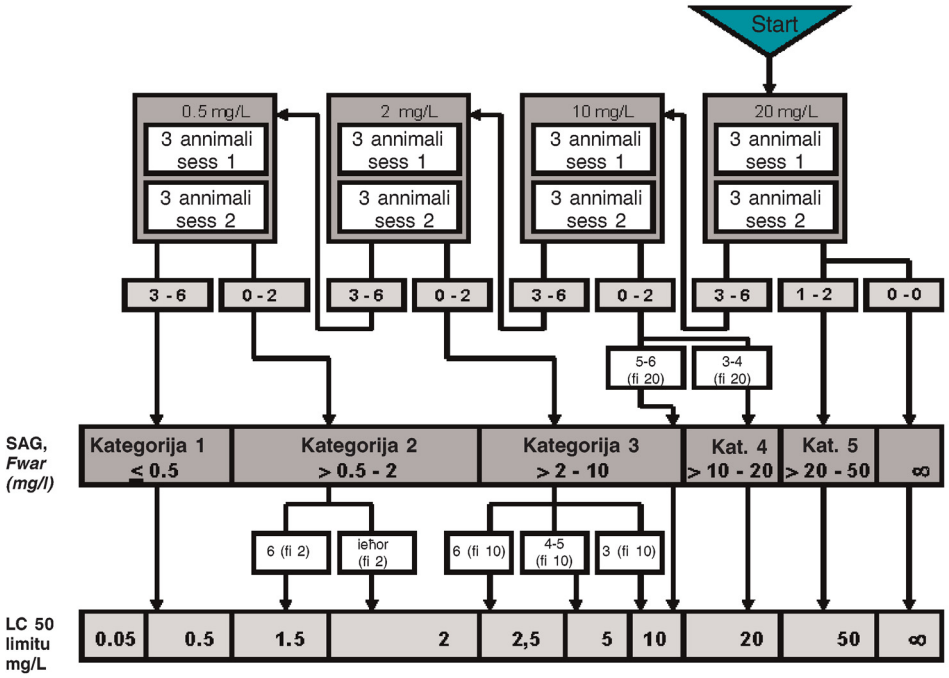
— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 3d

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 20 mg/L/4h għall-fwar



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

— Ittestjat fi ≥ 50 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 4

Proċedura li għandha tkun segwita minn kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-bidu għal aerosols (mg/l/4h)

Rimarki ġenerali ([1])

Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu, l-iskemi rispettivi ta' ttestjar kif inklużi f'dan l-Appendiċi jagħtu profil tal-proċedura li għandha tkun segwita.

Appendiċi 4a: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,05 mg/l

Appendiċi 4b: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,5 mg/l

Appendiċi 4c: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 1 mg/l

Appendiċi 4d: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 5 mg/l

Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

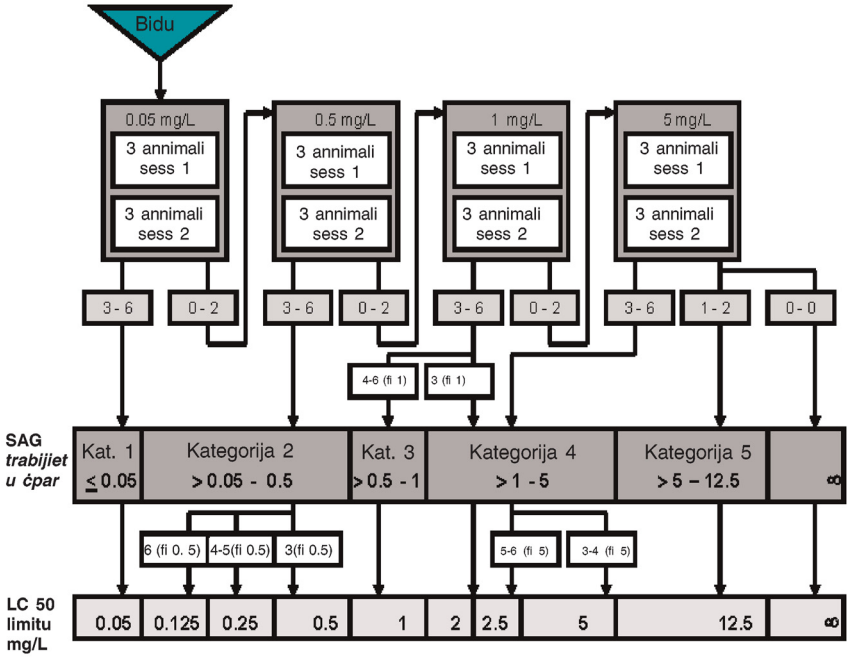
([1]) Fit-tabelli li ġejjin qed issir referenza għall-GHS (Sistema Globali Armonizata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossiċità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼M4

Appendiċi 4a

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 0,05 mg/L/4h għall-fwar



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju

— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata

— SAG: Sistema Armonizzata Globalment

— ∞: mhux ikklassifikat

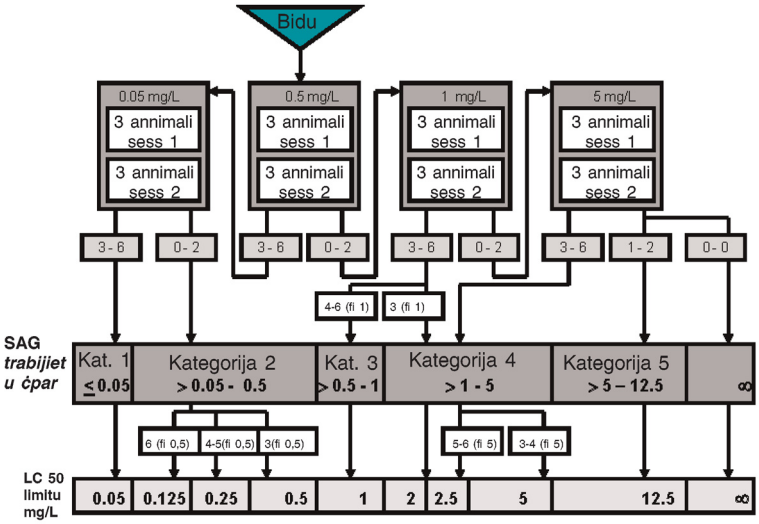
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 4b

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwalib'konċentrazzjonital-bidu ta' 0,5 mg/L/4h għall- aerosoli



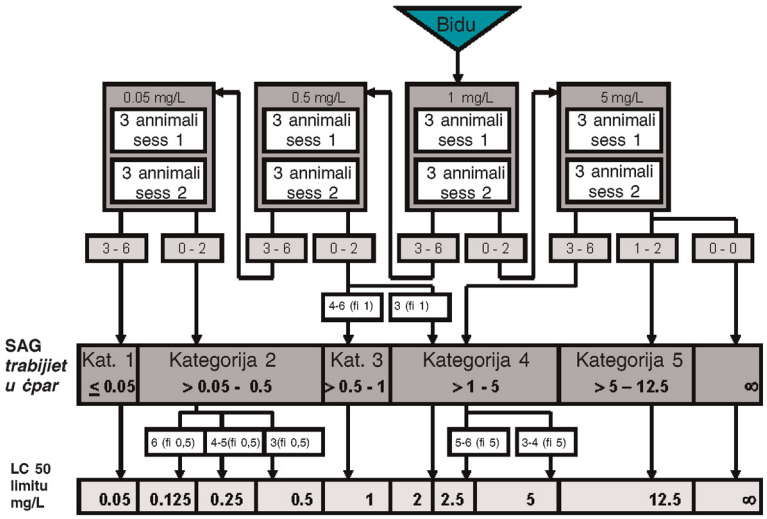
— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
— SAG: Sistema Armonizzata Globalment
— ∞: mhux ikklassifikat
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 4c

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwalib'konċentrazzjonital-bidu ta' 1 mg/L/4h għall- aerosoli



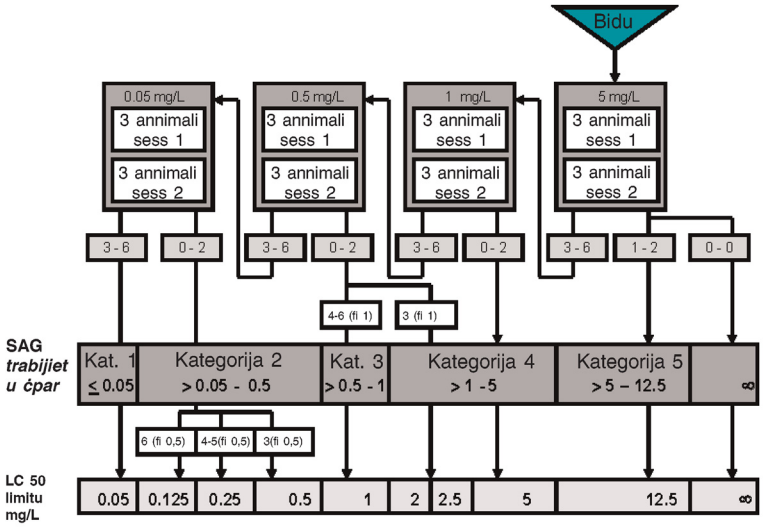
— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
— SAG: Sistema Armonizzata Globalment
— ∞: mhux ikklassifikat
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼M4

Appendiċi 4d

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 5 mg/L/4h g ħall- aerosoli



— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
— SAG: Sistema Armonizzata Globalment
— ∞: mhux ikklassifikat
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)"

▼B

PARTI Ċ: IL-METODI GĦAD-DETERMINAZZJONI TA' L-EKOTOSSIĊITÀ

WERREJ

C.1. TOSSIĊITÀ AKUTA GĦALL ĦUT

C.2. IT-TEST TA' L-IMMOBBILIZZAZZJONI AKUTA *DAPHNIA SP.*

C.3. ALKA TAL-ILMA ĦELU U ĊANOBATTERJI, TEST TA' INIBIZZJONI TAT-TKABBIR

C.4. DETERMINAZZJONI TAL-BIJODEGRADABBILITÀ LESTA

PARTI I. KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI

PARTI II. DOC TEST TAT-TNEĦĦIJA TAL-KULUR (Metodu C.4-A)

PARTI III. TEST TA' L-GĦAŻLA OECD MODIFIKATA (Metodu ºC.4-B)

PARTI IV. TEST TA' L-EVOLUZZJONI CO_2 (Metodu ºC.4-C)

PARTI V. TEST TAR-RESPIROMETRIJA MANJOMETRIKA (Metodu C.4-D)

PARTI VI. TEST TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ (Metodu ºC.4-E)

PARTI VII. TEST M.I.T.I. (Metodu ºC.4-F)

C.5. DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU BIOKEMIKALI

C.6. DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU KEMIKALI

C.7. ID-DEGRADAZZJONI – ID-DEGRADAZZJONI ANTIBI-JOTIKA: L-IDROLISI BĦALA FUNZJONI TAL-PH

C.8. IT-TOSSIĊITÀ TAL-ĦNIEX

C.9. ID-DEGREDAZZJONI BIJOLOĠIKA

C.10. TRATTAMENT TA' SIMULAZZJONI TESTAEROBIKA TAD-DRANAĠĠ: C.10-A: UNITAJIET TA' ĦAMA ATTIVAT - C.10-B: BIJORITI

C.11. BIODEGRADAZZJONI

C.12. BIODEGRADAZZJONI

C.13. BIJOKONĊENTRAZZJONI: *FLOW-THROUGH FISH TEST*

Ċ.14. PROVA TA' L-IŻVILUPP FIŻ-ŻGĦOŻIJA TAL-ĦUT

C.15. PROVA TA' TOSSIĊITÀ B'TERMINU QASIR FUQ *EMBRIJONI* U STADJI TA' SAC- FRY TAL-ĦUT

C.16. NAĦAL – PROVA TA' TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA

C.17. NAĦAL – PROVA TA' TOSSIĊITÀ AKUTA MILL-KUNTATT

C.18. ADSORBIMENT/DESORBIMENT BL-UŻU TAL-METODU TA' L-EKWILIBRIJU TA' GRUPPI

▼B

C.19.	ESTIMAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENT TA' ADSORPTION (K_{OC}) FUQ IL-ĦAMRIJA U FUQ ĦAMA TAD-DRENAĠĠ BL-UŻU TA' KROMATOGRAFIJA TA' LIKWIDU LI JIPPERFORMA GĦOLI (HPLC)
C.20.	*DAPHNIA MAGNA* REPRODUCTION TEST
C.21.	MIKROORGANIŻMI TAL-ĦAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAN- NITROĠENU
C.22.	MIKROORGANIŻMI TAL-ĦAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAL- KARBONJU
C.23.	TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIL-ĦAMRIJA
C.24.	TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIS-SEDIMENT TAS-SISTEMI AKWATIĊI
C.25.	MINERALIZZAZZJONI LI TEĦTIEĠ L-OSSIĠNU FL-ILMA TAL-WIĊĊ — TEST TAS-SIMULAZZJONI TAL-BIJODEGRADAZZJONI
C.26.	*LEMNA* SP. TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR

▼M4

C.27.	TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA BL-UŻU TA' SEDIMENT IMĦALLAT
C.28.	TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA BL-UŻU TA' ILMA FORTIFIKAT
C.29.	BIJODEGRADABBILTÀ FAĊLI - CO_2 F'REĊIPJENTI SSIĠILLATI (TEST TA' SPAZJU FUQ)
C.30.	AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' OLIGOCHAETES TERRESTRI

▼B

C.1. TOSSIĊITÀ AKUTA GĦALL ĦUT

1. METODU

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop ta' dan it-test huwa sabiex jiddetermina t-tossiċita letali akuta ta' sustanza għall-ħut fl-ilma ħelu. Huwa mixtieq li jkun ħemm, sa kemm ikun possibbli, informazzjoni dwar is-solubbiltà fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, l-istabbilità kimika, ilpkostanti tad-disassoċjazzjoni u tal-biodegrabbilità tas-sustanza sabiex tgħin fil-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq (statiku, semi-statiku jew ta' kurrent kontinwu) sabiex ikunu assigurati l-konċentrazzjoninijiet kostanti sodisfaċenti tas-sustanza tat-test matul il-perijodu tat-test.

Informazzjoni addizzjonali (per eżempju l-formula strutturali, il-grad tal-purità, n-natura u l-persentaġġ ta' impuritajiet sinifikanti, l-preżenza u l-ammonti ta' addittivi, u l-koeffiċjent tal-qasma n-oktonal/ilma) għandhom ikunu meqjusa kemm fl-ippjanar tat-test u fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Tossiċità akuta hija l-effett ħażin apparenti intiż f'organiżmu matul perijodu qasir (jiem) ta' l-espożizzjoni tiegħu għal sustanza. Fit-test preżenti, tossiċità akuta hija espressa bħala l-konċentrazzjonini medjana letali (LC_{50}), jiġifieri l-konċentrazzjoni fl-ima li toqtol 50 % f'lott ta' prova ta' ġut matul perijodu kontinwu ta' l-espożizzjoni li għandu jkun mistqarr.

Il-konċentrazzjoninijiet kollha tas-sustanza fit-test huma mogħtija bil-piż/volum (milligrammi kull litru). Dawn jistgħu ikunu espressi wkoll bħala piż bil-piż ($mg.kg^{-1}$).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanza ta' referenza tista tkun ittestjata bħala mezz sabiex turi li l-kondizzjonijiet waqt it-test fil-laboratorju, ir-reazzjoni tal-ispeċi ittestjati ma jkunux inbidlu b'mod sinifikanti.

L-ebda sustanzi ta' referenza ma huma speċifikati f'din il-kitba.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Test limitat jista' jkun imwettaq fi 100 mg kull litru sabiex tkun determinata li il-LC_{50} tkun akbar minn din il-konċentrazzjoni.

Il-ħut hu espost għas-sustanza tat-test miżjuda ma' l-ilma fil-medda tal-konċentrazzjonijiet għal perijodu ta' 96 siegħa. Il-mortalitajiet huma irreġistrati fi mill-anqas intervalli ta' 24 siegħa, u l-konċentrazzjoninijiet li joqtlu 50 % tal-ħut (LC_{50}) f'kull żmien ta' l-osservazzjoni huma ikkalkolati, meta dan ikun possibbli

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Il-kriterja tal-kwalità għandha tkun applikabbli għal-limitu tat-test kif ukoll għall-metodu tat-test kollu.

Il-mortalità fil-kontrolli m'għandhiex teċċedi 10 % (jew ħuta waħda jekk anqas minn għaxa jkunu wżati) sat-tmiem tat-test.

Il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb għandha tkun ta' aktar monn 60 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja matul iż-żmien kollu.

▼B

Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test għandhom jinżammu sa fil-limitu ta' 80 % tal-konċentrazzjoninijiet inizjali matul iż-żmien kollu tat-test.

Għal sustanzi li jdubu faċilment fil-medja tat-test, b'hekk ifornu taħlitiet stabbli, i.e. dawk li ma jkollhomx reazzjoni volatili sinifikanti, jkollhom degradazzjoni, ikunu idrolizzati jew adsorbiti, l-konċentrazzjoni inizjali tista tkun meqjusa bħala ekwivalenti tal-konċentrazzjoni nominali. Evidenza għandha tkun ippreżentata li l-livelli tal-konċentrazzjonijiet ikunu nżammu matul it-test u li l-kriterja tal-kwalità kienet ġiet milħuqa.

Għal sustanzi li huma:

(i) ftit li xejn jinħallu fil-medja tat-test, jew

(ii) kapaċi li jiffurmaw emulsjonijiet jew dispersjonijiet stabbli, inkella

(iii) ma humiex stabbli f'taħlitiet akweji,

l-konċentrazzjonini inizjali għandha tkun meqjusa bħala l-konċentrazzjoni mkejla fit-taħlita (jew, jekk teknikament dan ma jkunx possibbli, imkejla f'kolonna ta' l-ilma) fil-bidu tat-test. Il-konċentrazzjoni għandha tkun determinata wara perijodu ta' ekwilibriju imma qabel l-introduzzjoni tal-ħut tat-test.

Fi kwalunkwe minn dawn il-każi, aktar kejl għandu jsir matul it-test sabiex jikkonferma l-konċentrazzjoni attwali ta' l-espożizzjoni jew li l-kriterja tal-kwalità tkun ġiet milħuqha.

Il-pH m'għandux ivarja b'aktar minn unità waħda.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Tlett tipi ta' proċedura jistgħu ikunu wżati:

Test statiku:

Test tat-tossiċità li fih l-ebda ċaqlieq ma jseħħ tat-taħlita tat-test. (It-taħlitiet jinqgħu mingħajr tibdil matul iż-żmien kollu tat-test.)

Test semi-statiku:

Test mingħajr ċaqlieq tat-taħlita tat-test, imma bit-tiġdid regolari tal-lottijiet tat-taħlitiet tat-test eara perijodi mtawwla (eż. 24 siegħa).

Test biċ-ċaqlieq kontinwu:

Test tat-tossiċità li fih l-ilma jkun imġedded regolarment fil-kabini tat-test, il-kimika li tkun ittestjata tiġi trasportata ma l-ilma użat għat-tiġdid tal-medja tat-test.

1.6.1. **Reaġenti**

1.6.1.1. *Taħlitiet tas-sustanzi tat-test*

Taħlitiet diġa lesti tas-saħħa meħtieġa huma preparati bit-tidwib tas-sustanza f'ilma de-jonizzat jew f'ilma skond 1.6.1.2.

Il-konċentrazzjoni tat-test kif magħżula huma ippreparati bit-tidwib tat-taħlita diġà lest. Jekk konċentrazzjoninijiet għoljin huma ttestjati, is-sustanza tista' tkun imdewba direttament mat-trattib ta' l-ilma.

▼B

Is-sustanza għandha normalment tkun ittestjata biss sal-limitu tas-solubbilità tagħha. Għal uħud mis-sustanzi (eż. sustanzi li jkollhom solubbilità baxxa fl-ilma, jew P_{ow9} għoli, jew dawk li jiffurmaw tixriq stabbli pjuttost milli taħlita vera fl-ilma), huwa aċċettabbli li tintuża l-konċentrazzjonini tat-test aktar għolja mil-limitu tal-solubbilità tas-sustanza sabiex ikun assigurat li s-solubbilità massima/-stabbilità tal-konċentrazzjoni tkun intlaħqet. Huwa mportanti, b'danakollu, li din il-konċentrazzjoni ma tkunx b'mod ieħor tħawwad is-sistema tat-test (eż. li jkun hemm rita tas-sustanza fil-wiċċ ta' l-ilma li ma tħallix li jseħħ l-ossiġinazzjoni ta' l-ilma, eċċ.).

Tixrid ultrasoniku, solventi organiċi, emulsifikaturi jew dispersanti jistgħu jintużaw bħala għajnuna għat-tħejjija tat-taħlitiet bil-lest ta' sustanzi b'solubbilità baxxa fl-ilma jew sabiex jgħinu fit-tixrid ta' dawn is-sustanzi fil-medja tat-test. Meta tali sustanzi awżiljarji huma wżati, il-konċentrazzjoninijiet kollha tat-test għandhom jinkludu l-istess ammont tas-sustanza awżiljarja, u ħut addizzjonali tal-kontroll għandhom ikunu esposti għall-istess konċentrazzjoni tas-sustanza awżiljarja bħal dik użata fis-serje tat-test. Il-konċentrazzjoni ta' tali awżiljarji għandha tkun minimizzata, imma fl-ebda każ m'għandha teċċedi 100 mg kull litru fil-medja tat-test.

It-test għandu jkun imwettaq mingħajr l-aġġustament tal-pH. Jekk ikun hemm evidenza ta' tibdil qawwi fil-pH, huwa rakkomandat li t-test għandu jkun repetut bi pH aġġustat u r-riżultati inklużu fir-rapport. F'dak il-każ, il-valur tal-pH tat-taħlita bil-lest għandu jkun aġġustat għall-valur tal-pH ta' l-ilma tat-taħlit, sakemm ma jkunx hekk raġunijiet speċifiċi il-għala dan m'għandux isir. HCI u NaOH huma preferuti għal dan l-iskop. Dan l-aġġustament tal-pH għandu jsir b'tali mod hekk li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-taħlita bil-lest ma tkunx mibdula sa xi medda sinifikanti. Jekk ikun hemm xi reazzjoni kimika jew preċipitazzjoni fiżika tal-kompost tat-test ikkaġunata bl-aġġustament, dan għandu jkun mistqarr.

1.6.1.2. *Ilma taż-żamma u tat-trattib*

Forniment ta' ilma tax-xorb (mhux kontaminat b'konċentrazzjonijiet potenzalment ta' ħsara mill-klorin, metalli tqal jew sustanzi oħrajn), ilma naturali ta kwalità tajba jew ilma rikostitwita (ara l-Appendiċi I) jista jkun użat. Ilmijiet b'ebusija totali ta' bejn 10 u 250 mg kull litru (bħala $CaCO_3$) u bi pH minn 6,0 sa 8,5 huma preferuti.

1.6.2. **Apparat**

L-apparat kollu għandu jkun magħmul minn materjal kemikalment inert.

— sistema ta' taħlil awtomatiku (għal test b'ċaqlieq kontinwu),

— arloġġ ta' l-ossiġenu,

— apparat għad-determinazzjoni ta' l-ebusija ta' l-ilma,

— apparat adekwat għall-kontroll tat-temperatura,

— arloġġ pH.

1.6.3. **Hut tat-test**

Il-ħut għandu jkun f'kondizzjoni tajba tas-saħħa u ħieles minn xi malformazzjoni apparenti.

▼B

L-ispeċi użati għandhom ikunu magħżula fuq il-bażi ta' kriterja prattika, bħalma hija d-disponibbiltà faċli tagħhom matul is-sena, l-faċilità tal-manutenzjoni, l-konvenjenza għat-testijiet, is-sensittività relattiva għall-kimika u xi fatturi ekonomiċi, bioloġiċi u ekoloġiċi li jistgħu jaffettwaw ir-riżultati. Il-ħtieġa tal-kompattibbiltà tad-data akkwistat u l-armonizzazzjoni internazzjonali eżistenti (referenza 1) għandha wkoll tkun imfakkra meta ssir l-għażla tal-ispeċi tal-ħut.

Lista tal-ispeċi tal-ħut li huma rakkommandati għat-twettieq ta' dan it-test hija mogħtija fl-Appendiċi 2; il-ħut irrigat (taż-żebra) u t-trotta ikkulurita huma l-ispeċi preferuti.

1.6.3.1. *Iż-zamma*

Il-ħut tat-test preferibbilment jiġu minn lott wieħed ta' l-istess tul u età. Il-ħut għandu jinżamm għal mill-anqas 12-il jum, fil-kondizzjonijiet kif ġejjin:

tagħbija:

xierqa għas-sistema (riċirkolazzjoni jew kurrent kontinwu) u l-ispeċi tal-ħut,

l-ilma:

ara 1.6.1.2,

dawl:

12 sa 16-il siegħa ta' dawl kuljum,

konċentrazzjoni ta' ossiġenu mdewweb:

mill-anqas 80 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja,

ikel:

tlett darbiet fil-ġimgħa jew kull jum, jieqaf 24 siegħa qabel il-bidu tat-test.

1.6.3.2. *Mortalità*

B'segwiment tal-perijodu ta' 48 siegħa sakem joqgħodu, il-mortalitajiet huma reġistrati u din il-kriterja li ġejja għandha tkun applikata:

— aktar minn 10 % tal-popolazzjoni matul sebat ijiem:

ċaħda tal-lott kollu kemm hu,

— bejn 5 u 15 % tal-popolazzjoni:

perijodu taż-żamma ikompli għal sebat ijiem addizzjonali.

Jekk l-ebda mortalità ma sseħħ, il-lott huwa aċċettabbli, altrimentri għandu jkun miċħud,

— anqas minn 5 % tal-popolazzjoni:

aċċettazzjoni tal-lott.

1.6.4. **Adattazzjoni**

Il-ħut kollu għandu jkun espost għall-ilma tal-kwalità u tat-temperatura li jkunu wżati fit-test għal mill-anqas sebat ijiem qabel ma jintużaw.

▼B

1.6.5. **Proċedura tat-test**

Test tas-sejba tal-medda jista jipprevedi t-test definittiv, sabiex tkun akkwistata l-informazzjoni dwar il-medda tal-konċentrazzjonijiet li għandhom ikunu wżati fit-test ewlieni.

Kontroll wieħed mingħajr is-sustanza tat-test għandu jkun magħmul u, jekk relevanti, kontroll wieħed li jkun fih sustanza awżiljarja għandu wkoll ikun magħmul, b'żieda mas-serje tat-testijiet.

Jiddependi mill-proprjetajiet fiżiċi u kimiċi tal-kompost tat-test, test statiku, semi-statiku jew biċ-ċaqlieq kontinwu għandu jkun magħżul skond kif xieraq, sabiex iwettaq il-kriterja tal-kwalità.

Il-ħut huwa espost għas-sustanza kif deskritt hawn taħt:

— tul ta' żmien: 96 siegħa

— numru ta' l-annimali: mill-anqas 7 kull konċentrazzjoni,

— tankijiet: ta' daqs adattat b'relazzjoni mat-tagħbija rakkommandata,

— tagħbija: tagħbija massima ta' 1 g kull litru għal testijiet statiċi u semi-statiċi hija rakkommandata; għal sistemi ta' ċaqlieq kontinwu, tagħbija għola hija aċċettabbli

— konċentrazzjoni tat-test: Mill-anqas ħames konċentrazzjoninijiet li jiddifferixxu b'fattur kostanti li ma jeċċedix 2,2 u kemm jista jkun possibbli li jkopri l-medda ta' 0 sa 100 % mortalità.

— ilma: ara 1.6.1.2,

— dawl: 12 sa 16-il siegħa ta' dawl kuljum,

— temperatura: xierqa għall-ispeċi (l-Appendiċi 2) imma fi ħdan ± 1 °C skond it-test partikolari,

— konċentrazzjoni ta' ossiġenu mdewweb: mhux anqas minn 60 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja fit-temperatura magħżula,

— ikel: xejn.

Il-ħut ikunu spezzjonati wara l-ewwel 2 sa 4 siegħat u mill-anqas matul intervalli ta' 24 siegħa. Il-ħut huma meqjusa bħala mejta jekk meta jkunu minsusa fil-pedunkula kawdjali ma jipproduċu l-ebda reazzjoni u l-ebda movimenti tan-nifs ma jkunu viżibbli. Il-ħut mejta jkunu mneħħija malli dan ikun osservat u l-mortalitajiet huma reġistrati. Reġistri jinżammu ta' annormalitajiet viżibbli (eż. talf ta' l-ekwilibriju, tibdil fl-imġieba ta' l-għawm, funzjoni respiratorja, pigmentazzjoni, eċċ.).

Il-kejl tal-pH, l-ossiġenu mdewweb u tat-temperatura għandhom jitwettqu ta' kuljum.

Test ta' limitazzjoni

Bl-użu tal-proċeduri deskritti f'dan il-metodu tat-test, test tal-limitazzjoni jista jkun imwettaq fi 100 mg kull litru sabiex ikun muri li l-LC_{50} ikun akbar minn din il-konċentrazzjoni.

Jekk in-natura tas-sustanza tkun tali li konċentrazzjoni ta' 100 mg kull litru fl-ima tat-test ma tistax tkun milħuqha, it-test tal-limitazzjoni għandu jkun imwettaq f'konċentrazzjoni egwali għas-solubbilità tas-sustanza (jew tal-konċentrazzjoni massima li tifforma tixrid stabbli) fil-medja użata (ara wkoll il-punt 1.6.1.1).

▼B

It-test tal-limitazzjoni għandu jkun imwettaq bl-użu ta' minn 7 sa 10 ħutiet, bl-istess numru ta' kontroll(i). (It-teorija binominali tiddetta li meta 10 ħutiet huma wżati b'mortalità żero, ikun hemm 99,9 % affidabbilità li l-LC_{50} huwa akbar mill-konċentrazzjonini użata f'dak it-test tal-limitazzjoni. Bi 7, 8 jew 8 ħutiet, l-assenza tal-mortalità tipprovdi mill-anqas 99 % affidabbilità li l-LC_{50} huwa akbar mill-konċentrazzjoni użata.)

Jekk ikun hemm mortalijiet, studju sħiħ għandu jkun imwettaq. Jekk effetti sub-letali huma osservati, dawn għandhom ikunu reġistrati.

2. **DATA U EVALWAZZJONI**

Għal kull perijodu ta' meta l-osservazzjonijiet kienu reġistrati (24, 48, 72 u 96 siegħa), pinġi l-persentaġġ tal-mortalità għal kull perijodu ta' l-espożizzjoni kif rakkommandat kontra l-konċentrazzjoni fuq karta tal-probabbiltà logaritmika,

Meta possibbli u għal ħin ta' l-osservazzjoni, l-LC_{50} u l-limiti tal-kunfidenza (p = 0,05) għandhom ikunu ikkalkolati bl-użu tal-proċeduri normali; dawn il-valuri għandhom ikunu mqarrba lejn wieħed, l-aktar lejn tnejn, figuri sinifikanti (eżempji tat-tqarrib lejn żewġ figuri: 170 għal 173,5; 0,13 għal 0,127; 1,2 għal 1,21).

F'dawk il-każi meta l-linja magħwġa bil-kurva tal-konċentrazzjoni/-persentaġġ tar-reazzjoni tkun wieqfa wisq sabiex tippermetti l-kalkolazzjoni tal-LC_{50}, estimi grafiċi ta' dan il-valur huma suffiċjenti.

Meta żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi, b'relattività ta' 2,2 jagħtu biss 0 u 100 % mortalità, dawn iż-żewġ valuri huma suffiċjenti sabiex jindikaw il-medda li fiha jkun jiddħol il-LC_{50}.

Jekk ikun osservat li l-istabbilità jew l-omoġenità tas-sustanza tat-test ma jistgħux jinzammu dan għandu jkun irrapportat u qies għandu jittieħed fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— informazzjoni dwar il-ħut tat-test (isem xjentifiku, razza, fornitur, xi pre-trattament, daqs u numru użat f'kull konċentrazzjoni tat-test);

— is-sorsi tat-trattib – ilma u l-karatteristiċi kimiċi maġġuri (pH, ebusija, temperatura);

— fil-każ ta' sustanza b'solubilità akwea baxxa, l-metodu tal-preparazzjoni tat-taħlitiet kemm dawk imħejjija lesti u tat-test;

— konċentrazzjoni ta' xi sustanzi awżiljarji;

— lista tal-konċentrazzjonijiet użati u xi informazzjoni disponibbli dwar l-istabbilità tal-konċentrazzjonijiet tal-kimika ittestjata fit-taħlita tat-test;

— jekk analiżi kimika titwettaq, metodi wżati u r-riżultati akkwistati;

— r-riżultati tat-test tal-limitazzjoni, jew imwettaq;

— ir-raġunijiet tal-għażla u d-dettalji tal-proċedura tat-test kif użata (eż. statiku, semi-statiku, rata tad-dożar, rata taċ-ċaqlieq kontinwu, jekk huma mogħti l-arja, t-tagħbija tal-ħut, eċċ.);

▼B

— deskrizzjoni ta' l-apparat tat-test;

— l-organizzazzjoni tad-dawl;

— il-konċentrazzjonijiet ta' l-ossiġenu mdewweb, il-valuri pH u t-temperaturi tat-taħlitiet tat-test kull 24 siegħa;

— evidenza tal-kriterja tal-kwalità li tkun ġiet imwettqa;

— tabella li turi il-mortalità kumulattiva ta' kull konċentrazzjoni u l-kontroll (u l-kontroll bis-sustanza awżiljarja, jekk meħtieġ) f'kull wieħed mill-ħinijiet rakkommandati ta' l-osservazzjoni;

— grafika tal-konċentrazzjoni/persentaġġ tal-kurva tar-reazzjoni fit-tmiem ta' kull test;

— jekk possibbli, l-valuri LC_{50} f'kull wieħed mill-ħinijiet rakkommandati ta' l-osservazzjoni (bi 95 % tal-limiti ta' l-affidibbiltà);

— proċedura statistiċi wżati għad-determinazzjoni tal-valuri LC_{50};

— jekk tkun użata sustanza ta' referenza, r-riżultati akkwistati,

— l-ogħla konċentrazzjoni tat-test li ma toħloq l-ebda mortalità matul il-perijodu tat- test;

— l-anqas konċentrazzjoni tat-test li toħloq 100 % mortalità matul il-perijodu tat-test.

4. **REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, Linji ta' Gwida tat-Testijiet 203, Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali u aġġornamenti.

(2) AFNOR – Determinazzjoni tat-tossiċità akuta ta' sustanza mal-Brachydanio rerio -Metodi Statiċi u ta' Caqlieq Kontinwu – NFT 90-303 Ġunju 1985.

(3) AFNOR – Determinazzjoni tat-tossiċità akuta ta' sustanza mal-Salmo gairdneri -Metodu Statiku – ta' Caqlieq Kontinwu – NFT 90-305 Ġunju 1985

(4) ISO 7346/1,/2 u/3 – Kwalità ta' l-ilma – Determinazzjoni tat-tossiċità letali akuta ta' sustanzi għall-ħut ta' l-ilma frisk (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan -Teleostei, Cyprinidae). Parti 1: Metodu statiku. Parti 2: Metodu semi-statiku. Parti 3: Metodu biċ-ċaqlieq kontinwu.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Test tat-tossiċità akuta għall-ħut.

(8) NEN 6506 – Ilma – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata, 1980.

(9) Aġenzija tal-Ħarsien Ambjentali, Metodi għal testijiet tat-tossiċità akuta mal-ħut, makroinvertebrati u amfibji. Il-Kumitat dwar il-Metodi għat-Testijiet tat-Tossiċità ma l-Organiżmi Akwatiċi, Serje tar-Riċerka Ekoloġika EPA-660-75-009, 1975.

(10) Aġenzija tal-Ħarsien Ambjentali, Laboratorju tal-moniteraġġ u sostenn ambjentali, Uffiċju tar-Riċerka u Żvilupp, EPA-600/4-78-012, Jannar 1978.

▼B

(11) Aġenzija tal-Ħarsien Ambjentali, Kontroll tas-Sustanza Tossika, Parti IV, 16 ta' Marzu 1979.

(12) Metodi normali għall-eżaminazzjoni ta' l-ilma u l-ilma skartat, l-erbatax edizjoni, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej, Programm tat-test Inter-Laboratorju li jikkonċerna l- istudju ta' l-ekotossiċità ta' sustanza kimika fir-rigward tal-ħut. Studju KEE D.8368, 22 Marzu 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umwelt-chemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. u Wilcoxon, F., Metodu simplifikat għall-eval-wazzjoni ta' l-esperimenti ta' l-effetti tad-doża, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Metodi Statistiċi fl-Assaġġ Bioloġiku. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Kejl tat-tossiċità tat-tniġġis għall-ħut. Metodi tal-Bioassaġġ għal tossiċità akuta. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Kejl tat-tossiċità tat-tniġġis għall-ħut. II L-utiliz-zazzjoni u l-applikar tar-riżultati tal-bioaassaġġ. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Metodi għal kalkolazzjoni ta' LC_{50}. Fl-Eval-wazzjoni tat-Tossikoloġija u l-Periklu Akwatiku (bl-edizjoni ta' F.I. Mayer u J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, ºC.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. u Andrews, R.W. Programm tal-computer għal kalkolazzjoni ta' LC50. US EPA.

▼B

Appendiċi 1

Ilma rikostitwit

Eżempju ta' trattib xieraq ta' l-ilma

Il-kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

L-ilma għandu jkun distillat ta' kwalità tajba, jew ilma dejonizzat b'konduttività ta' anqas minn 5 μScm^{-1}.

Apparat għad-distillazzjoni ta' l-ilma m'għandux ikun fih xi partijiet magħmula mir-ramm.

Taħlitiet bil-lest

$CaCI_2$. (Diħidrat tal-klorid tal-kalċju):	11,76 g
Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.	
$MgSO_4$. (ħeptaidrat tas-sulfat tal-magneżju):	4,93 g
Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.	
$NaHCO_3$ NaHCO3 (karbonat ta' l-idroġenu tas-sodju):	2,59 g
Dewweb fi, fl-ilma u wassal għal litru bl-ilma.	
KC1 (klorid tal-putassa):	0,23 g
Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.	

Ilma rikostitwit għat-tidwib

Ħawwad 25 ml ta' kull wieħed ta' l-erba taħlitiet bil-lest u wassal sa litru bl-ilma.

Qawwi bl-arja sakemm il-konċentrazzjonini ta' l-ossiġenu mdewweb tkun egwali għall-valur tas-saturizzazzjoni ta' l-arja.

Il-pH għandu jkun 7,8 ± 0,2.

Jekk meħtieġ, aġġusta il-pH bi NaOH (idrossidu tas-sodju) jew HCI (aċidu idrokloriku).

L-ilma tat-trattib hekk ippreparat huwa mwarrab għal madwar 12-il siegħa u l-ebda arja aktar ma tkun miżjuda.

Is-somma tal-jonji Ca u Mg f'din it-taħlita hija ta' 2,5 mmol kull litru. Ir-relattività tal-jonji Ca:Mg hija 4:1 u tal-joni Na:K hija 10:1. L-alkalinità totali ta' din it-taħlita hija 0,8 mmol kull litru.

Kwalunkwe devjazzjoni fil-preparazzjoni ta' l-ilma tat-trattib m'għandhiex tibdel il-komposizzjoni jew il-proprjetajiet ta' l-ilma.

▼B

Appendiċi 2:

Speċi ta' ħut rakkommandat għat–testijiet

Speċje rakkommandati	Medda rakkommandata tat-Temperatura tat-Test (ºC)	Tul total rakkommandat ta' l-annimal tat-test (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Ħut-Zebrab	20 sa 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow (ħut ta' l-ilma ħelu)	20 sa 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Karpjun komuni	20 sa 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Killifish ħamrani	20 sa 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 sa 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill	20 sa 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Trota kulurita	12 sa 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Orfe dehbi	20 sa 24	6,0 ± 2,0

Ġabra

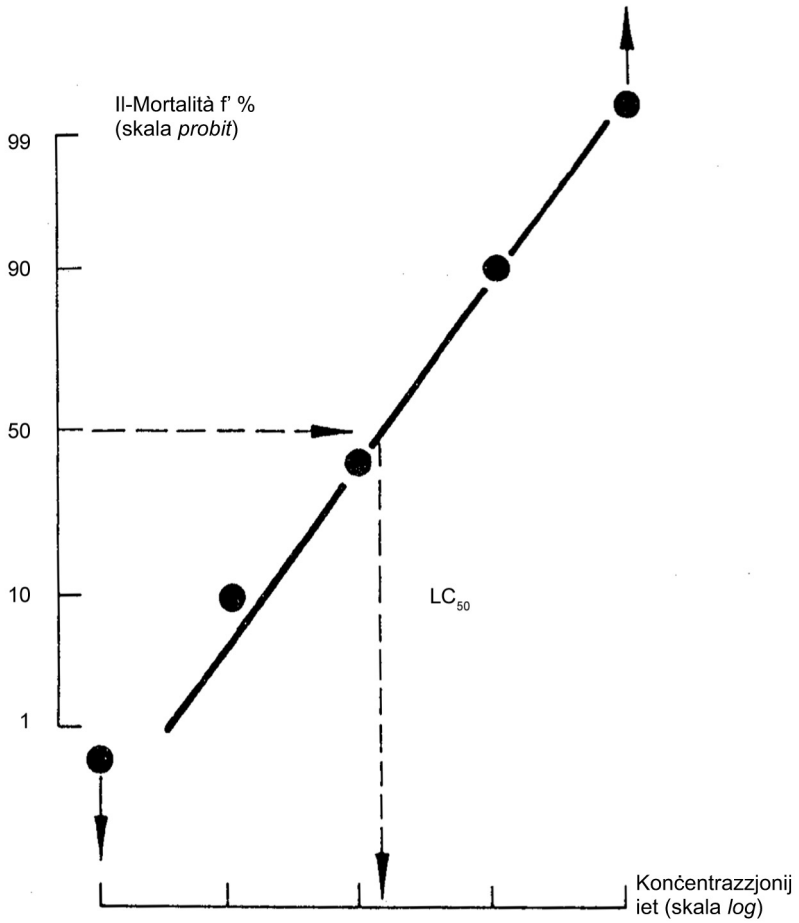
Il-ħut elenkat hawn fuq huma faċli sabiex jitkabbru u/jew faċilment disponibbli matul is-sena kollha. Dawn jistgħu ikunu mkabbra u ikkultivati jew fl-irzizet tal-ħut jew fil-laboratorju, f'kondizzjonijiet ikkontrollati dwar il-mard u l-parassiti, hekk li l-annimal tat-test ikunu b'saħħtu u ta' nisel magħruf. Dan il-ħut huwa disponibbli f'ħafna partijiet tad-dinja.

▼B

Appendiċi 3

Eżempju tal-konċentrazzjonini: persentaġġ tal-mortalità

Eżempju tad-determinazzjoni ta' LC_{50} bl-użu tal-karta *log-probit*



▼B

C.2. **IT-TEST TA' L-IMMOBBILIZZAZZJONI AKUTA *DAPHNIA SP.***

1. **METODU**

Dan il-metodu tat-test ta' immobbilizzazzjoni akuta huwa ekwivalenti għall-OECD TG 202 (2004).

1.1. DAĦLA

Dan il-metodu jiddeskrivi test ta' tossiċità akuta biex jiġu stmati l-effetti tal-kimiċi lejn id-dafnidi. Intużaw metodi tat-test eżistenti safejn possibbli (1)(2)(3).

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Fil-kuntest ta' dan il-metodu, jintużaw dawn id-definizzjonijiet li ġejjin:

EC_{50}: hija l-konċentrazzjoni stmata li timmobbilizza 50 % tad-dafnidi f'perjodu ta' espożizzjoni dikjarat. Jekk tintuża definizzjoni oħra, din għandha tiġi rrapportata, flimkien mar-riferenzi tagħha.

Immobilizzazzjoni: Dawk l-annimali li huma li ma jistgħux jgħumu fi żmien 15-il sekonda, wara aġitazzjoni bil-mod tal-kontenitur tat-test jitqiesu li huma immobbilizzati (ukoll jekk għadhom jistgħu jċaqalqu l-antenni tagħhom).

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Dafnidi żgħar, ta' eta' ta' inqas minn 24 siegħa fil-bidu tat-test, huma esposti għas-sustanza tat-test f'varjetà ta' konċentrazzjonijiet għal perjodu ta' 48 siegħa. L-immobbilizzazzjoni hija rrekordjata ma' l-24 siegħa u mat-48 siegħa u mqabbla mal-valuri tal-kontroll. Ir-riżultati huma analizzati sabiex jiġi kkalkolat l-EC_{5O} fit-48 siegħa (ara t-taqsima 1,2 għad-definizzjonijiet). Id-determinazzjoni ta' l-EC_{5O} fl-24 siegħa mhijiex obbligatorja.

1.4 L-INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Is-solubbiltà fl-imla u l-pressa tal-fwar tas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufa u għandu jkunu disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fit-taħlitiet tat-test b'effiċjenza ta' l-irkupru rrapportata, u limitu tad-determinazzjoni. Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza, l-istabilità fl-ilma jew fid-dawl, P_{ow} u r-riżultati ta' test għall-bijodegradibbiltà lesta (ara l-metodu C.4).

Nota: Il-gwida għall-ittestjar ta' sustanzi bil-kwalitajiet fiżiċi kimiċi li għamluhom diffiċli li jiġu ttestjati hija pprovduta f' (4).

1.5 IS–SUSTANZI TA' RIFERENZA

Sustanza ta' riferenza tista' tiġi ttestjata għal EC_{5O} bħala mezz biex jiġi żgurat li l-kondizzjonijiet tat-test huma affidabbli. It-tossikanti użati fit-testijiet ċirku internazzjonali (1)(5) huma rrakkomandati għal dan l-għan ([1]). It-test(ijiet) b'sustanza ta' riferenza għandhom preferibbilment isiru kull xahar u għall-inqas darbtejn fis-sena.

([1]) Ir-riżultati ta' dawn it-testijiet inter-laboratorji u Korriġendum Tekniku għall-ISO 6341 jagħtu EC_{50} – 24 h tad-dikromat tal-potassju ($K_2Cr_2O_7$) fil-firxa bejn 0,6 mg/l u 1,7 mg/l.

▼B

1.6 IL–KRITERJI TAL–KWALITÀ

Biex test ikun validu, jgħoddu dawn il-kriterji operattivi:

— Fil-kontrolli, inkluż il-kontroll li fih l-aġent li jħoll, mhux aktar minn 10 % tad-dafnidi għandhom ikunu ġew immobilizzati;

— Il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu maħlul fl-aħħar tat-test għandha tkun ≥ 3 mg/l fil-kontenituri tal-kontroll u tat-test.

Nota: Għall-ewwel kriterju, mhux aktar minn 10 % tad-dafnidi tal-kontroll għandhom juru immobilizzazzjoni jew sinjali oħra ta' mard jew stress, per eżempju, diskolorazzjoni, mġiba mhux normali bħal li jinqabdu f'wiċċ l-ilma.

1.7 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.7.1. **L-Apparat**

Il-kontenitur tat-test u apparat ieħor li se jiġi f'kuntatt mat-taħlitiet tat-test għandhom ikunu magħmula għal kollox mill-ħġieġ jew minn materjal ieħor li huwa kimikament inert. Il-kontenituri tat-test normalment ikunu tubi tat-test tal-ħġieġ jew tazzi biż-żennuna; għandhom jitnaddfu qabel kull użu bl-użu ta' proċeduri standard tal-laboratorju. Il-kontenituri tat-test għandhom ikunu koperti ħafif biex jitnaqqas it-telf ta' l-ilma minħabba evaporazzjoni u biex jiġi evitat id-dħul tat-trab fit-taħlitiet. Is-sustanzi volatili għandhom l-ewwel jiġu ttestjati f'kontenituri magħluqin li huma mimlijin sa fuq, u li huma kbar biżżejjed biex jiġi prevenut li l-ossiġnu jibda jillimita jew ikun baxx wisq (ara t-taqsima 1.6 u l-ewwel paragrafu tat-taqsima 1.8.3).

Barra minn dan, jintuża xi ftit mit-tagħmir li ġej jew kollu: miter ta' l-ossiġnu (b'mikroelettrodu jew tagħmir ieħor xieraq biex jitkejjel l-ossiġnu f'kampjuni b'volumi baxxi); miter tal-pH; apparat xieraq għall-kontroll tat-temperatura; tagħmir għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni totali tal-karbonu organiku (TOC – *total organic carbon concentration*); tagħmir għad- determinazzjoni tat-talba ta' l-ossiġnu kimiku (COD – *chemical oxygen demand*); tagħmir għad-determinazzjoni ta' l-ebusija, eċċ.

1.7.2 **L-organiżmu tat-test**

Daphnia magna Straus hija l-ispeċje preferuta tat-test għalkemm speċje oħrajn *Daphnia* xierqa jistgħu jintużaw f'dan it-test (eż. *Daphnia pulex*). Fil-bidu tat-test, l-annimali għandu jkollhom inqas minn 24 siegħa u biex titnaqqas il-varjabbiltà, huwa rakkomandat bis-saħħa li ma jkunux l-ewwel friegħ tat-tifqisa. Għandhom ikunu derivati minn tifqisa b'saħħitha (jiġifieri ma juru l-ebda sinjali ta' stress bħall-mortalità għolja, il-preżenza ta' maskili u ephippia, dewmien fil-produzzjoni ta' l-ewwel tifqisa, annimali li jmurilhom il-kulur, eċċ.). L-organiżmu kollha użati għal test partikolari għandhom ikunu oriġinaw mill-istess tifqisa ta' dafnidi. L-annimali tat-tifqisa għandhom jinżammu fil-kondizzjonijiet tal-kultura (dawl, temperatura, medju) simili għal dawk li għandhom jintużaw fit-test. Jekk il-mezz tal-kultura tad-dafnidi li għandu jintuża fit-test huwa differenti minn dak użat għall-kultura rutina tad-dafnidi, hija prattika tajba li jiġi inkluż test ta' l-akklimatizzazzjoni ta' qabel it-test. Għal dak, id-dafnidi tat-tifqisa għandhom jinżammu fl-ilma tat-taħlit fit-temperatura tat-test għal mhux inqas minn 48 siegħa qabel il-bidu tat-test.

▼B

1.7.3. **L-ilma taż-żamma u tat-taħlit**

L-ilma naturali (l-ilma tal-wiċċ u ta' l-art), l-ilma rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat huma aċċettabbli bħala ilma taż-żamma u tat-taħlit jekk id-dafnidi jissopravivu fihom għal kemm idum il-kulturazzjoni, l-akklimatizzazzjoni jew l-ittestjar mingħajr ma jintwerew sinjal ta' stress. Kwalunkwe ilma li jikkonforma mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma tat-taħlit aċċettabbli kif elenkat fl-Anness 1 huwa xieraq bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. L-ilma rikostitwit jista' jsir biż-żjieda ta' ammonti speċifiċi ta' reaġenti ta' grad analitiku magħruf għal ilma deonizzat jew distillat. Eżempji ta' ilma rikostitwit jingħataw f'(1) (6) u fl-Anness 2. Innota li l-medja li fihom aġenti li jikkombinaw jonu tal-metall ma' kompost kimiku (*chelating agent*), bħall-medji M4 u M7 fl-Anness 2, għandhom jiġu evitati sustanzi tat-test li fihom il-metalli. Il-pH għandu jkun fil-firxa ta' 6 sa 9. Hija rrakkomandata l-ebusija bejn 140 u 250 mg/l (bħala $CaCO_3$) għal *Daphnia Magna*, filwaqt li tista' wkoll tkun xierqa ebusija inqas għal speċje oħrajn ta' *Daphnia*. L-ilma tat-taħlit jista' jiġi arjat qabel ma jintuża għat-test sabiex il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu mħallat tkun laqħet is-saturazzjoni.

Jekk jintuża l-ilma naturali, il-parametri tal-kwalità għandhom jitkejlu għall-inqas darbtejn fis-sena jew kull meta huwa ssuspettat li dawn il-karatteristuċi setgħu nbidlu b'mod sinjifikanti (ara l-paragrafu ta' qabel u l-Anness 1). Il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) għandu jsir ukoll. Jekk jintuża ilma tal-vit deklorinat, l-analiżi kuljum tal-klorin hija mixtieqa. JEkk l-ilma tat-taħlit huwa minn għajn ta' l-ilma fil-wiċċ jew fl-art, għandhom jitkejlu l-konduttività u l-karbonu organiku totali (TOC) jew it-talba għall-ossiġnu kimiku (COD).

1.7.4 **It-taħlitiet tat-test**

It-taħlitiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula normalment huma ppreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni ta' stokk. Is-soluzzjonijiet ta' stokk preferibbilment għandhom jiġu ppreparati billi s-sustanza tat-test tinħall fl-ilma tat-taħlit. Sa fejn huwa possibbli, l-użu tas-solventi, l-emulsifikanti jew id-dispersanti għandu jiġi evitat. Madankollu, dawn il-komposti jistgħu jkunu meħtieġa f'xi każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ta' stokk li hija kkonċentrata kif xieraq. Il-gwida dwar solventi, emulsifikanti u d-dispersanti xierqa tingħata f' (4). Fi kwalunkwe każ is-sustanza tat-test fit-taħlitiet tat-test m'għandhiex teċċedi l-limitu ta' solubbiltà fl-ilma tat-taħlita.

It-test għandu jsir mingħajr l-aġġustament tal-pH. Jekk il-pH ma jibqax fil-firxa 6 – 9, imbagħad jista' jsir test ieħor, bl-aġġustament tal-pH tas-soluzzjoni ta' stokk skond dak ta' l-ilma tat-taħlit qabel ma tiżdied is-sustanza tat-test. L-aġġustament tal-pH għandu jsir b'tali mod li l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ta' stokk ma tinbidilx sa livell sinjifikanti u li ma tiġi kkaużata ebda reazzjoni kimika jew preċipitazzjoni tas-sustanza tat-test. Huma ppreferuti HCl u NaOH.

▼B

1.8 IL-PROĊEDURA

1.8.1. **Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.8.1.1. *Il-gruppi tat-test u l-kontrolli*

Il-konteniturі tat-test jimtlew bil-volumi xierqa ta' l-ilma tat-taħlit u t-taħlitiet tas-sustanza tat-test. Il-proporzjon tal-volum ta' arja/ilma għandha tkun identika għall-grupp tat-test u tal-kontroll. Imbagħad id-dafnidi jitqiegħdu fil-konteniturі tat-test. Għall-inqas 20 annimal, preferibbilment maqsuma f'erba' gruppi ta' ħames annimali kull wieħed, għandhom jintużaw għal kull konċentrazzjoni tat-test (jiġifieri volum ta' 10 ml għal ħames dafnidi għal kull vettura tat-test). It-test jista' jsir bl-użu ta' tiġdid semi-statiku jew sistema ta' flow-through meta l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test mhijiex stabbli.

Serje ta' kontroll waħda ta' l-ilma ta' dilwizzjoni kif wkoll, jekk rilevanti, serje ta' kontroll waħda li fiha l-aġent solubilizzanti għandhom isiru flimkien mas-serje tat-trattament.

1.8.1.2 *Il-konċentrazzjonijiet tat-test*

Jista' jsir test biex tinsab il-firxa sabiex tiġi ddeterminata l-firxa ta' konċentrazzjonijiet għat-test definittiv kemm-il darba ma tkunx disponibbli l-informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test. Għal dan l-għan, id-dafnidi huma esposti għal serje ta' konċentrazzjonijiet spazjati ħafna tas-sustanza tat-test. Ħames dafnidi għandhom jiġu esposti għal kull konċentrazzjoni tat-test għal 48 siegħa jew inqas, u ma huma neċessarji ebda replikati. Il-perjodu ta' espożizzjoni jista' jitqassar (eż. 24 siegħa jew inqas) jekk id-data xierqa għall-għan tat-test biex tinsab il-firxa tista' tinkiseb f'inqas żmien.

Għandhom jintużaw għall-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test. Għandhom jiġu rranġati f'serje ġeometriċi b'fattur ta' separazzjoni li preferibbilment ma jeċċedix 2,2. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet. L-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha preferibbilment tirriżulta fl-immobbilizzazzjoni ta' 100 fil-mija, u l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa ttestjata għandha preferibbilment ma tagħti ebda effett osservabbli.

1.8.1.3. *Il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni*

It-temperatura għandha tkun bejn 18 °C u 22 °C, u għal kull test uniku għandha tkun kostanti sa ± 1 °C. Huwa rakkomandat ċiklu ta' 16-il siegħa dawl u 8 sigħat dlam. Huwa aċċettabbli wkoll id-dlam totali, speċjalment għas-sustanzi tat-test li mhumiex stabbli fid-dawl. Il-konteniturі tat-test m'għandhomx jiġu arjati matul it-test.

It-test isir mingħajr aġġustament tal-pH. Id-dafnidi m'għandhomx jiġu mitmugħa matul it-test.

1.8.1.4 *Kemm idum it-test*

It-test idum 48 siegħa.

1.8.2 **Osservazzjonijiet**

Kull kontenitur tat-test għandu jiġi vverifikat għal dafnidi immobilizzati fl-24 u fit-24 siegħa wara l-bidu tat-test. (ara t-taqsima 1,2 għad-definizzjonijiet). Minbarra l-immobilità, kwalunkwe mġieba jew dehra mhux normali għandha tiġi rrapportata.

▼B

1.8.3. **Kejl analitiku**

L-ossiġnu imħallat u l-pH jiġu mkejla fil-bidu u fl-aħħar tat-test fil-kontroll(i) u fl-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza. Il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu maħlul fil-kontrolli għandha tkun skond il-kriterji tal-validità (ara t-taqsima 1.6). Il-pH normalment m'għandux ivarja b'aktar minn 1.5 unitajiet fi kwalunkwe test. Normalment it-temperatura tiġi mkejla fil-konteniturі tal-kontroll jew fl-arja ta' l-ambjent u preferibbilment għandha tiġi rreġistrata kontinwament matul it-test, jew, bħala minimu, fil-bidu u fl-aħħar tat-test.

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tiġi mkejla mhux inqas minn fl-ogħla konċentrazzjoni tat-test u f'dik l-aktar baxxa, fil-bidu u fl-aħħar tat-test (4). Huwa rakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejla. Iżda, jekk hemm provi li juru li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test inżammet b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-bidu matul it-test kollu, ir-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri mkejla nominali jew tal-bidu.

1.9 IT-TEST TAL-LIMITU

Bl-użu tal-proċeduri deskritti f'dan il-Metodu, jista' jsir test tal-limitu b'100 mg/l sustanza tat-test jew sa l-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-mezz tat-test (dak li huwa l-aktar baxx fosthom) sabiex jintwera li l-EC_{5O} huwa akbar minn din il-konċentrazzjoni. It-test tal-limitu għandu jsir bl-użu ta' 20 dafnida (preferibbilment maqsuma f'erba' gruppi ta' ħamsa), bl-istess numru fil- kontroll(i). Jekk isseħħ immobilizzazzjoni, għandu jsir studju sħiħ. Għandha tiġi rrekordjata kwalunkwe mġieba osservata li mhijiex normali.

2. **DATA**

Id-data għandha tiġi mqassra f'forma tabulari, li turi għal kull grupp ta' trattament u l-kontroll, l-għadd ta' dafnidi użati, l-immobilizzazzjoni f'kull osservazzjoni. Il-persentaġġ immobbilizzati fl-24 siegħa u fit-48 siegħa huma mpinġija fuq djagramma kontra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Id-data hija analizzata permezz ta' metodi statistiċi xierqa. (eż. analiżi *probit*, eċċ.) biex jiġu kkalkolati l-gradjenti tal-kurvi ta' l-EC_{5O} b'limiti ta' kunfidenza ta' 95 % (p = 0,05) (7) (8).

Fejn il-metodi standard biex jinħadem l- EC_{5O}, ma jgħoddux għad-data miksuba, l-ogħla konċentrazzjoni li ma tikkaġuna ebda immobilità u l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tipproduċi immobilità ta' 100 % għandhom jintużaw bħala approssimazzjoni għall- EC_{5O} (għaliex dan huwa l-medju ġeometriku ta' dawn iż-żewġ konċentrazzjonijiet).

3. **L-IRRAPPORTAR**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi għall-inqas din l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżiċi-kimiċi;

▼B

— data ta' l-identifikazzjoni kimika, inkluża l-purità.

L-ispeċje tat-test:

— l-għajn u l-ispeċje tad-*Daphnia*, min jipprovdi l-għajn (jekk magħruf) u l- kondizzjonijiet tal-kultura użati (inkluża l-għajn, it-tip u l-ammont ta' l-ikel, il-frekwenza ta' l-għalf).

Il-kondizzjonijiet tat-test:

— deskrizzjoni tal-kontenituri tat-test: tip ta' kontenituri, volum tat-taħlita, għadd ta' dafnidi għal kull kontenitur tat-test, għadd ta' kontenituri tat-test (replikati) għal kull konċentrazzjoni;

— metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' stokk u tat-test inkluż l-użu ta' kwalunkwe solvent jew dispersanti, il-konċentrazzjonijiet użati;

— dettalji ta' l-ilma tat-taħlit: il-karatteristiċi tal-kwaliità ta' l-għajn u ta' l-ilma (pH, ebusija, proporzjon Ca/Mg, proporzjon Na/K, alkalinità, konduttività, eċċ.);

— il-kompożizzjoni ta' l-ilma kkostitwit mill-ġdid jekk jintuża;

— il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni: it-temperatura, l-intensità u l-perjodiċità tad- dawl, l- ossiġnu maħlul, il-pH, eċċ.

Riżultati:

— l-għadd u l-persentaġġ ta' dafnidi li ġew immobilizzati jew li wrew xi effetti avversi (inkluża mġieba mhux normali) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament, f'kull ħin ta' osservazzjoni u deskrizzjoni tan-natura ta' l-effetti osservati;

— ir-riżultati u d-data tat-test imwettaq bis-sustanza ta' riferenza, jekk disponibbli;

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test u r-riżultat ta' l-analiżi kollha biex tiġi ddeterminata s-sustanza tat-test fil-kontenituri tat-test; l-effiċjenza ta' l-irkupru u l-limitu tad-determinazzjoni għandhom ukoll jiġu rrapportati;

— il-kejl kollu fiżiku-kimiku tat-temperatura, tal-pH u ta' l-ossiġenu maħlul li sar matul it-test;

— l-EC_{5O} fl-48 siegħa għall-immobbilizzazzjoni b'intervalli ta' kunfidenza u graffs tal-mudell użat għall-kalkolu tagħhom, l-angolatura tal-kurvi tad-doża ta' rispons u l-iżball standard tagħhom; il-proċeduri statistiċi użati għad-determinazzjoni ta' l-EC_{5O}; (dawn l-elementi ta' data għall-immobbilizzazzjoni fl-24 siegħa għandhom jiġu rrapurtati wkoll meta jkunu tkejlu)

— spjegazzjoni ta' kwalunkwe devjazzjoni mill-Metodu tat-Test u jekk id-devjazzjoni affetwatx ir-riżultati tat-test.

4. **REFERENZI**

1. ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850,1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter- laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 -American Society for Testing and Materials. Pp65-84

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

L-ANNESS 1

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAT-TAĦLIT AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjoni
Materja f'partiċelli	< 20 mg/l
Karbonu organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mingħajr ioni	< 1 µg/l
Klorin residwali	< 10 µg/l
Il-pestiċidji organofosfori totali	< 50 ng/l
Il-pestiċidji organofosfori totali flimkien ma' *polychlorinated biphenyls*	< 50 ng/l
Il-klorin organiku totali	< 25 ng/l

▼B

L-ANNESS 2

EŻEMPJI TA' IL-A TAT-TEST KOSTITWIT MILL-ĠDID XIERAQ

Ilma tat-test ISO (1)

Soluzzjonijiet ta' stokk (sustanza waħda)		Biex tipprepara l-ilma kkostitwit mill-ġdid, żid dawn il-volumi li ġejjin ta' taħlitiet tat-tifqisiet ma' litru ilma (*)
Susstanza	Ammont miżjud ma' litru ilma (*)	
Calcium chloride $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Sulfat tal-manjeżju $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bikarnobat tas-sodju $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kloridu tal-potassju KCl	0,23 g	25 ml

(*) Ilma ta' safa xierqa, eż. deonizzat, distillat jew *reverse osmosis* b'kondottività li preferibbilment ma teċċedix 10 µS.cm^{-1}.

Il-mezz Elendt M7 u M4

L-Akklimazzjoni għall-mezz Elendt M4 u M7

Xi laboratorji esperjenzaw diffikoltà biex jittrasferixxu direttament id-Daphnia għall-mezz M4 u M7. Madankollu, inkiseb xi suċċess bl-akklimazzjoni gradwali, jiġifieri li jiċċaqalqu mill-mezz tagħhom għal 30 % Elendt, u mbagħad għal 60 % Elendt u mbagħad għal 100 % Elendt. Jista' jkun li l-perjodi ta' akklimazzjoni jkunu jeħtieġu li jkunu twal daqs xahar.

Il-preparazzjoni

Element traċċa

Soluzzjonijiet ta' stokk separati (I) ta' elementi traċċi individwali huma l-ewwel ippreparati f'ilma ta' safa xierqa, eż. deonizzat, distillat jew *reverse osmosis*. Minn dawn it-taħlitiet tat-tifqisiet differenti (I) taħlita tat-tifqisiet oħra (II) tiġi ppreparata, li jkun fiha l-elementi traċċi kollha (soluzzjoni kkombinata), jiġifieri:

Taħlita/i tat-tifqisa I (sustanza waħda)	Ammont miżjud ma' lima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal-mezz M4)	Biex tipprepara s-soluzzjoni ta' stokk kkombinata II, żid dan l-ammont li ġej ta' soluzzjoni ta' stokk I ma' l-ilma (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000- darba	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000- darba	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000- darba	1,0	0,25

▼B

Taħlita/i tat-tifqisa I (sustanza waħda)	Ammont miżjud ma' lima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal-mezz M4)	Biex tipprepara s-soluzzjoni ta' stokk kkombinata II, żid dan l-ammont li ġej ta' soluzzjoni ta' stokk I ma' l-ilma (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000- darba	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000- darba	1,0	0,25
NaBr	320	20 000- darba	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000- darba	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000- darba	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000- darba	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000- darba	1,0	1,0
KI	65	20 000- darba	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000- darba	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000- darba	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000- darba	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000- darba	—	—

Kemm it-taħlitiet Na 2 EDTA u $FeSO_4$ huma ppreparati waħdehom, imferrgħin flimkien u awtoklavati mill-ewwel.

Dan jagħti:

Taħlita 2 l EDTA		1 000- darba	20,0	5,0

Mezzi M4 u M7

Il-mezzi M4 u M7 huma ppreparati bl-użu tas-soluzzjoni ta' stokk II, il-makro-nutrienti u l-vitamini kif ġej:

	Ammont miżjud ma' l-ima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal- mezz M4)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokk II miżjuda mal-mezz ippreparat (ml/l)	
			M4	M7
Soluzzjoni ta' stokk II (elementi traċċi kkombinati)		20-darba	50	50
Taħlitiet tat- tifqisa makro nutrienti (sustanza waħda)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000- darba	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000- darba	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000- darba	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000- darba	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000- darba	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000- darba	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000- darba	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000- darba	0,1	0,1

▼B

	Ammont miżjud ma' l-ima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal- mezz M4)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokk II miżjuda mal-mezz ippreparat (ml/l)	
			M4	M7
Taħlita ta' vitamini kkombinati	—	10 000- darba	0,1	0,1
It-taħlita ta' vitamini kkombinati hija ppreparata biż- żjieda tat-3 vitamini ma' litru ta' ilma, kif jidher hawn taħt:				
Thiamine hydrochloride	750	10 000- darba		
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10 000- darba		
Biotine	7,5	10 000- darba		

It-taħlita tal-vitamini kkombinati tiġi maħżuna ffriżata f'alikwoti żgħar. Il-vitamini jiżdiedu mal-mezz ftit qabel l-użu.

N.B: Biex tiġi evitata l-preċipitazzjoni ta' l-imluħ meta jiġu ppreparati il-mezzi kollha, żid l-*aliquots* tat-taħlitiet tat-tifqisiet sa madwar 500 – 800 ml ilma deonizzat u mbagħad imla sa litru.

N.B: L-ewwel pubblikazzjoni tal-mezz M4 tista' tinsab f'Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M1

C.3. **ALKA TAL-ILMA HELU U ĊANOBATTERJI, TEST TA' INIBIZZJONI TAT-TKABBIR**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 201 (2006) (1).

1.1. INTRODUZZJONI

Il-Metodi ta' Ttestjar jiġu perjodikament riveduti u aġġornati fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-Metodu ta' Ttestjar C.2 kellu bżonn jiġi rivedut sabiex jinkludi speċijiet addizzjonali u sabiex jilħaq ir-rekwiżiti tal-valutazzjoni tal-periklu u l-klassifikazzjoni tal-kimiki. Ir-reviżjoni tlestiet fuq il-bażi ta' esperjenza prattika estensiva, progress xjentifiku fil-qasam ta' studji tat-tossiċità tal-alka, u użu regolatorju estensiv, li seħħew minn żmien l-adozzjoni oriġinali.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-definizzjonijiet u t-taqsiriet li ġejjin huma użati għall-għanijiet ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar:

Bijomassa: hija l-piż niexef ta' materja ħajja preżenti f'popolazzjoni espress f'termini ta' volum partikolari; eż. mg alka/litru soluzzjoni tat-test. Is-soltu l-"bijomassa" hija mfissra bħala massa, iżda f'dan it-test, din il-kelma hija użata sabiex tirreferi għall-massa skont il-volum. Ukoll f'dan it-test, sostituti għall-bijomassa, bħall-għadd ta' ċelloli, fluworexxenza, eċċ. huma imkejla tipikament u l-użu tat-terminu "bijomassa" għalhekk jirreferi għal dan il-kejl ta' sostituzzjoni ukoll.

Koeffiċjent ta' varjazzjoni: huwa kejl bla dimensjoni tal-varjabbiltà ta' parametru, imfisser bħala l-proporzjon tad-devjazzjoni fissa għall-medja. Dan jista' wkoll jiġi espressa bħala valur perċentwali. Il-koeffiċjent medju ta' varjazzjoni tar-rata speċifika medja ta' tkabbir f'koltivazzjonijiet ta' kontroll replikati għandha tiġi kkalkulata kif ġej:

1. Ikkalkula % CV tar-rata medja speċifika ta' tkabbir mir-rati tat-tkabbir ta' kuljum/sezzjoni b'sezzjoni għar-replika rispettiva.

2. Ikkalkula l-valur medju tal-valuri kollha kkalkulati fil-punt 1 sabiex tikseb il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni tar-rata speċifika ta' tkabbir ta' kuljum/sezzjoni b'sezzjoni f'koltivazzjonijiet ta' kontroll replikati. ECx:

hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test li tiġi tinħall fil-midjum tat-test li tirriżulta f'x % (eż. 50 %) tnaqqis fit-tkabbir tal-organiżmu tat-test fi żmien ċertu perjodu ta' esponiment (li għandu jissemma espliċitament jekk ivarja mit-tul massimu jew normali tat-test). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew mill-prodott, is-simboli "E_rC" u "E_yC" jiġu użati rispettivament.

Midjum ta' tkabbir: huwa l-midjum sħiħ sintetiku ta' koltivazzjoni li fih jikbru l-alka tat-test meta jiġu esposti għas-sustanza tat-test. Is-sustanza tat-test tiġi normalment maħlula fil-midjum tat-test.

Rata ta' tkabbir (rata medja speċifika ta' tkabbir): hija ż-żieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu ta' esponiment.

▼M1

L-Anqas Effett ta' Konċentrazzjoni Osservat (LOEC): hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata fejn is-sustanza hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis fuq it-tkabbir li huwa statistikament sinifikanti (f'p, 0.05) meta mqabbla mal-kontroll, matul ċertu perjodu ta' esponiment. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test li jkunu 'l fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett li jagħmel il-ħsara daqs jew akbar minn dawk osservati f'LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu sodisfatti, trid tingħata spjegazzjoni dettaljata għal kif l-LOEC (u għalhekk l-NOEC) ġie magħżul.

L-Ebda Effett ta' Konċentrazzjoni Osservat (NOEC): huwa l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC.

Varjabbli ta' rispons: hija varjabbli ta' stima ta' tossiċità li ġejja minn parametri mkejla li jiddeskrivu l-bijomassa b'metodi ta' kalkolu differenti. Għal dan il-metodu, rati ta' tkabbir u prodott huma varjabbli ta' rispons li ġejjin mill-kejl dirett tal-bijomassa jew wieħed mis-sostituti msemmija.

Rata speċifika ta' tkabbir: hija varjazzjoni ta' rispons mfissra bħala l-kwozjent tad-differenza tal-logaritmi naturali ta' parametru ta' osservazzjoni (f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-bijomassa) u l-perjodu ta' ħin rispettivi.

Prodott: huwa l-valur ta' kejl li jvarja fl-aħħar tal-perjodu ta' esponiment bi tnaqqis tal-valur tal-kejl li jvarja fil-bidu tal-perjodu tal-esponiment sabiex jesprimi ż-żieda fil-bijomassa matul it-test.

1.3. APPLIKABILITÀ TAT-TEST

Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa applikat l-aktar faċilment għal sustanzi li jinħallu fl-ilma li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, x'aktarx jibqgħu fl-ilma. Għall-ittestjar ta' sustanzi li ma jibqgħux fl-ilma, li jixterdu ħafna, kuluriti, li għandhom livell baxx ta' solubilità fl-ilma jew sustanzi li jistgħu jaffettwaw d-disponibbilità tan-nutrijenti jew minerali fil-midjum tat-test, ċertu modifikazzjonijiet tal-proċedura deskritta jistgħu jkunu rikjesti (eż. sistema magħluqa, kundizzjonar tar-reċipjenti tat-test). Gwida dwar modifikazzjonijiet approprjati hija mogħtija f'(2), (3) u (4).

1.4. PRINĊIPJU TAT-TEST.

L-għan ta' dan it-test huwa li jiġi determinat l-effett ta' sustanza fuq it-tkabbir ta' alka mikroskopika tal-ilma ħelu u/jew ċanobatterji. Organiżmi tat-test li jikbru esponenzjalment huma esposti għas-sustanza tat-test fi grupp ta' koltivazzjonijiet għal perjodu normalment ta' 72 siegħa. Minkejja ż-żmien relattivament qasir għat-twettiq tat-test, jistgħu jiġu vvalutati effetti fuq diversi ġenerazzjonijiet.

Ir-rispons tas-sistema huwa n-nuqqas ta' tkabbir f'serje ta' koltivazzjonijiet ta' alka (unitajiet tat-test) esposti għall-konċentrazzjonijiet varji ta' sustanza tat-test. Ir-rispons huwa vvalutat bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni tal- esponiment mqabbla mat-tkabbir medju tar-replika, koltivazzjonijiet kontrollati li ma humiex esposti. Għal espressjoni sħiħa tar-rispons tas-sistema għal effetti tossiċi (sensittività ottima), il-koltivazzjonijiet jitħallew jikbru b'mod li ma huwiex esponenzjalment ristrett taħt kundizzjonijiet ta' nutrizzjoni suffiċjenti u dawl kontinwu għal perjodu ta' żmien suffiċjenti sabiex jitkejjel it-tnaqqis tar-rata speċifika ta' tkabbir.

▼**M1**

It-tkabbir u l-inibizzjoni ta' tkabbir huma kkwantifikati minn kejl tal-bijomassa tal-alka bħala funzjoni tal-ħin. Il-bijomassa tal-alka hija mfissra bħala l-piż niexef skont il-volum, eż. mg alka/litru tas-soluzzjoni tat-test. Huwa madankollu diffiċli li jitkejjel il-piż niexef u għalhekk jintużaw parametri ta' sostituzzjoni. Minn dawn is-sostituti, kwantitajiet ta' ċelloli jintużaw l-aktar ta' spiss. Parametri oħra ta' sostituzzjoni jinkludu volum ta' ċellola, fluworexxenza, densità ottika, eċċ. Fattur ta' konverżjoni bejn il-kejl tal-parametru ta' surrogazzjoni u l-bijomassa għandu jkun magħruf.

Il-konklużjoni tat-test hija l-inibizzjoni tat-tkabbir, espress bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa (rata medja ta' tkabbir speċifika) matul il-perjodu ta' esponiment. Mir-rata medja ta' tkabbir speċifika reġistrata f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni ġġib magħha x % speċifikat ta' rata ta' inibizzjoni ta' tkabbir (eż. 50 %) determinata u espressa bħala l-E_rC_x (eż. E_rC_{50}).

Għall-applikazzjoni ta' dan il-metodu fi ħdan il-qafas regolatorju tal-UE, il-kalkolu tar-riżultati għandu jkun ibbażat fuq medja ta' rata ta' tkabbir speċifika għar-raġunijiet deskritti fit-taqsima 2.2 hawn taħt. Rispons varjabbli addizzjonali użat f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa prodott, li jista' jkun meħtieġ sabiex jintlaħqu rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'ċertu pajjiżi. Hija mfissra bħala bijomassa fl-aħħar tal-perjodu ta' esponiment li minnha tnaqqas il-bijomassa fil-bidu tal-perjodu ta' esponiment. Mill-prodott reġistrat f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni ġġib magħha x % speċifikat ta' rata ta' inibizzjoni ta' prodott (eż. 50 %) determinata u espressa bħala l-E_yC_x (eż. E_yC_{50}).

Minbarra dan, l-anqas effett ta' konċentrazzjoni użat (LOEC) u l-ebda effett ta' konċentrazzjoni osservat (NOEC) jista' jiġi ddeterminat statistikament.

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Informazjoni fuq is-sustanza tat-test, li tista' tkun meħtieġa sabiex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test, tinkludi l-formula strutturali, purità, stabbiltà fid-dawl, stabbiltà taħt il-kundizzjonijiet tat-test, proprjetajiet ta' assorbiment ta' dawl, pKa, u riżultati ta' studji ta' trasformazzjoni li jinkludu bijodegradabilità fl-ilma.

Is-solubilità fl-ilma, il-koeffiċjent ta'qsim tal-ilma tal-octanol (P_{ow}) u l-pressa tal-fwar tas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufa, u metodu li ġie validat għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test b'reġistrazzjoni tal-effiċjenza ta' rkupru u l-limitu tal-kixfa għandhom ikunu disponibbli.

1.6. IS-SUSTANZA TA' REFERENZA

Is-sustanza(i) ta' referenza, bħal 3,5-dichlorophenol użata fit-test internazzjonali taċ-ċirku (4), tista tiġi ittestjata bħala midjum ta' iċċekkjar tal-proċedura tat-test. Il-potassju tad-dichromate jista' jiġi wkoll użat bħala sustanza ta' referenza għal alka ħadra. Huwa desiderabbli li sustanza ta' referenza tiġi ttestjata minn tal-inqas darbtejn f'sena.

1.7. VALIDITÀ TAT-TEST.

Sabiex it-test ikun validu, għandu jkun hemm konformità mal-kriterji ta' eżekuzzjoni li ġejjin:

▼M1

— Il-bijomassa fil-koltivazzjonijiet taħt kontroll għandha tkun żdiedet esponenzjalment b'fattur ta' mill-anqas 16 matul il-perjodu tat-test ta' 72 siegħa. Din tikkorrispondi għal rata ta' tkabbir speċifika ta' 0.92 ġurnata^{-1}. Għall-ispeċi użata l-aktar ta' spiss, ir-rata ta' tkabbir is-soltu hija sostanzjalment ogħla (ara l-Appendiċi 1). Dan il-kriterju ma jistax jintlaħaq meta jiġu użati l-ispeċi li jikbru aktar bil-mod minn dawk imniżżla fl-Appendiċi 1. F'dan il-każ, il-perjodu tat-test għandu jiġi estiż sabiex jinkiseb tkabbir tal-inqas ta' 16-il darba f'koltivazzjonijiet taħt kontroll, fil-waqt li t-tkabbir għandu jkun esponenzjali matul il-perjodu tat-test. Il-perjodu tat-test jista' jiġi mnaqqas tal-inqas għall-48 siegħa sabiex jinżamm tkabbir esponenzjali illimitat matul it-test, sakemm il-fattur ta' multiplikazzjoni minimu ta' 16 jintlaħaq.

— Il-koeffiċjent medju ta' varjazzjoni għall-rati ta' tkabbir speċifiċi sezzjoni b'sezzjoni (ġurnata 0-1, 1-2 u 2-3, għal testijiet ta' 72 siegħa) f'koltivazzjonijiet taħt kontroll (ara t-taqsima 1.2 taħt "koeffiċjent ta' varjazzjoni") ma jistgħux jeċċedu 35 %. Ara it-tieni paragrafu fit-taqsima 2.2.1 għall-kalkulazzjoni ta' rata ta' tkabbir speċifika sezzjoni b'sezzjoni. Dan il-kriterju japplika għall-valur medju ta' koeffiċjenti ta' varjazzjoni kkalkulati għall-koltivazzjonijiet taħt kontroll li huma replikati.

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni ta' rati medji ta' tkabbir speċifiċi matul il-perjodu sħiħ tat-test f'koltivazzjonijiet taħt kontroll li huma replikati ma jridx jeċċedi 7 % f'testijiet bil-*Pseudokirchneriella subcapitata* u *Desmodesmus subspicatus*. Għal speċi ittestjati b'mod inqas ta' spiss, il-valur ma jistax jeċċedi l-10 %.

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.8.1. **Apparat**

Reċipjenti tat-test u apparat ieħor, li ser jiġu f'kuntatt mas-soluzzjonijiet tat-test għandhom ikunu magħmula totalment minn ħġieġ jew materjal ieħor li huwa kimikament inattiv. L-apparat għandu jiġi maħsul sewwa sabiex jiġi żgurat li l-ebda kontaminanti organiċi jew inorganiċi jistgħu jindaħlu fit-tkabbir tal-alka jew fil-kompożizzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test.

Ir-reċipjenti tat-test normalment ikunu fliexken tal-ħġieġ ta' dimensjonijiet li jħallu volum suffiċjenti ta' koltivazzjoni għall-kejl matul it-test u trasferiment suffiċjenti ta' massa ta' CO_2 mill-atmosfera (ara t-tieni paragrafu fit-taqsima 1.8.9). Ta' min jinnota li l-volum tal-likwidu jrid ikun suffiċjenti għal determinazzjonijiet analitiċi (ara l-ħames paragrafu fit-taqsima 1.8.11).

Barra minnn hekk, xi uħud jew kull wieħed mill-apparat hawn taħt imsemmi huma meħtieġa:

— Apparat ta' culturing: gabinett jew kamra hija rakkomandata, fejn it-temperatura ta' inkubazzjoni magħżula tista' tiġi miżmuma għal ± 2 °C.

— Strumenti ta' kejl ta' dawl: huwa importanti li jiġi nnotat li l-metodu ta' kejl tal-intensità tad-dawl, u b'mod partikolari t-tip ta' riċevitur (kollettur), ser jaffettwa l-valur imkejjel. Preferibbilment, il-kejl għandu jiġi magħmul permezz ta' riċevitur sferiku (4 π) (li jirrispondi għal dawl dirett u rifless mill-angoli kollha fuq u taħt il-pjan ta' kejl), jew riċevitur ta' 2 π (li jirrispondi għal dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl).

▼M1

— Apparat sabiex jiddetermina l-bijomassa tal-alka. L-għadd ta' ċelloli, li huwa l-parametru ta' sostituzzjoni użat l-aktar ta' spiss għall-bijomassa tal-alka, jista' jiġi magħmul permezz tal-użu ta' magna li tgħodd il-partiċelli elettroniċi, mikroskopju b'kamra tal-għadd, jew cytometer ta' fluss. Sostituti oħra għall-bijomassa jistgħu jiġu mkejla permezz ta' cytometer ta' fluss, fluorimeter, spectrophotometer jew colorimeter. Fattur ta' konverżjoni li jaqleb l-għadd ta' ċelloli f'piż niexef huwa ta' għajnuna sabiex isiru l-kalkulazzjonijiet. Sabiex jiġi pprovdut kejl li jkun ta' użu f'kunċentrazzjonijiet baxxi ta' bijomassa meta jintuża spectrophotometer, jista' jkun neċessarju li jintużaw tubi trasparenti (cuvettes) b'passaġġ ta' dawl minn tal-inqas ta' 4 ċm.

1.8.2. **Organiżmi tat-test.**

X'uħud mill-ispeċi ta' alka mikroskopika u ċanobatterji li ma humiex imwaħħla jistgħu jiġu użati. Ġie ppruvat permezz tal-proċedura tat-test speċifikata f'dan il-Metodu ta' Ttestjar li r-razez imniżżla fl-Appendiċi 1 huma adattati..

Jekk speċi oħra jiġu użati, ir-razza u/jew l-oriġini għandhom jiġu rrappurtati. Għandu jiġi kkonfermat li t-tkabbir esponenzjali tal-alka magħżula għat-test jista' jinżamm matul il-perjodu tat-test taħt il-kundizzjonijiet prevalenti.

1.8.3. **Midjum ta' tkabbir**

Żewġ midja alternattivi ta' tkabbir, l-midja OECD u AAP, huma rakkomandati. Il-kompożizzjoni ta' dawn il-midja tidher fl-Appendiċi 2. Ta' min jinnota li l-valur tal-pH inizjali u l-kapaċita li tnaqqas l-impatt (tirregola ż-żieda ta' pH) taż-żewġ midja huma differenti. Għalhekk ir-riżultati tat-testijiet jistgħu jkunu differenti skont il-midjum użat, partikolarment meta sustanzi li jonizzaw jiġu ttestjati.

Modifikazzjonijiet tal-midja ta' tkabbir jistgħu jkunu meħtieġa għal ċertu għanijiet, eż. meta jiġu ttestjati metalli u chelating agents jew ittestjar għal valuri differenti ta' pH. Użu ta' midjum modifikat irid ikun deskritt f'dettal u ġustifikat (3)(4).

1.8.4. **Konċentrazzjoni ta' bijomassa inizjali**

Il-bijomassa inizjali f'koltivazzjonijiet tat-test għandha tkun l-istess fil-koltivazzjonijiet tat-test kollha u suffiċjentement baxxa sabiex jitħalla tkabbir esponenzjali matul il-perjodu ta' inkubazzjoni mingħajr riskju li jispiċċaw in-nutrijenti. Il-bijomassa oriġinali ma għandiex teċċedi 0.5 mg/l bħala piż niexef. Il-konċentrazzjonijiet ta' ċelloli li ġejjin huma rakkomandati:

Pseudokirchneriella subcapitata	5×10^3-10^4	ċelloli/ml
Desmodesmus subspicatus	$2\text{-}5 \times 10^3$	ċelloli/ml
Navicula pelliculosa	10^4	ċelloli/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	ċelloli/ml
Synechococcus leopoliensis	5×10^4-10^5	ċelloli/ml

1.8.5. **Konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test**

L-isfera ta' konċentrazzjoni fejn l-effetti x'aktarx jiġru tista' tiġi determinata fuq il-bażi ta' riżultati minn testijiet sabiex tinstab l-imsemmija sfera. Għat-test finali definittiv, mill-inqas ħames konċentrazzjonijiet arranġati f'serje ġeometrika b'fattur li ma jeċċedix 3.2 għandu jingħażel. Għal sustanzi tat-test li juru kurva ċatta ta' rispons għal konċentrazzjoni, fattur ogħla jista' jkun ġustifikat. Is-serjiet ta' konċentrazzjoni għandhom preferibbilment jestendu fuq il-klassi li jikkawżaw rata ta' inibizzjoni ta' tkabbir ta' alka ta' 5-75 %.

▼M1

1.8.6. **Repliki u kontrolli**

Id-disinn tat-test għandu jinkludi tliet repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test. Jekk id-determinazzjoni tan-NOEC ma huwiex meħtieġ, id-disinn tat-test jista' jiġi mibdul sabiex jiżdiedu l-għadd ta' konċentrazzjonijiet u jonqsu l-għadd ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. L-għadd ta' repliki ta' kontroll irid ikun minn tal-inqas tlieta, u idealment għandu jkun darbtejn l-għadd ta' repliki użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.

Sett separat ta' soluzzjonijiet tat-test jista' jiġi ppreparat għal determinazzjonijiet analitiċi tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test (ara r-raba' u s-sitt paragrafi f'sezzjon 1.8.11).

Meta materjal li jħoll huwa użat sabiex iħoll is-sustanza tat-test, kontrolli addizzjonali li jikkontjenu l-materjal li jħoll fl-istess konċentrazzjoni bħal dik użata fil-koltivazzjonijiet tat-test trid tiġi inkluża fid-disinn tat-test.

1.8.7. **Preparazzjoni ta' koltivazzjoni mlaqqma**

Sabiex l-alka tat-test tiġi adattata għall-kundizzjonijiet tat-test u jiġi żgurat illi l-alke huma fil-fażi ta' tkabbir esponenzjali meta użati sabiex tinnokula s-soluzjonijiet tat-test, koltivazzjoni mlaqqma fil-midjum tat-test hija ippreparata 2-4 ijiem qabel il-bidu tat-test. Il-bijomassa tal-alka għandha tiġi irranġata sabiex tħalli t-tkabbir esponenzjali jipprevali fil-koltivazzjoni mlaqqma sakemm it-test jibda. Il-koltivazzjoni mlaqqma għandha tiġi inkubata taħt l-istess kundizzjonijiet tal-koltivazzjonijiet tat-test. Kejjel iż-żieda tal-bijomassa fil-koltivazzjoni mlaqqma sabiex tiżgura li t-tkabbir huwa ġewwa l-portata normali għar-razza tat-test taħt kundizzjonijiet ta' culturing. Eżempju tal-proċedura għal culturing tal-alka huwa deskritt fl-Appendiċi 3. Sabiex jiġu evitati diviżjonijiet ta' ċelloli sinkroniċi matul it-test, it-tieni pass ta' propagazzjoni tal-koltivazzjoni mlaqqma jista' jkun meħtieġ.

1.8.8. **Preparazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test**

Is-soluzzjonijiet tat-test kollha jridu jikkontjenu l-istess konċentrazzjonijiet ta' midjum ta' tkabbir u bijomassa inizjali tal-alke tat-test. Soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula solitament huma ppreparati billi titħawwad soluzzjoni ta' stock tas-sustanza tat-test mal-midjum ta' tkabbir u koltivazzjoni mlaqqma. Soluzzjonijiet ta' stock huma normalment ippreparati billi s-sustanza tiġi maħlula fil-midjum tat-test.

Materjali li jħollu, eż. acetone, alkoħol t-butyl u dimethyl formamide, jistgħu jiġu użati bħala reffiegħa sabiex iżidu sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma mal-midjum tat-test (2)(3). Il-konċentrazzjoni ta' solventi ma għandhiex teċċedi 100 µl/l, u l-istess konċentrazzjoni ta' solventi għandha tiġi miżjuda mal-koltivazzjonijiet kollha (li jinkludi l-kontrolli) fis-serjiet tat-test.

1.8.9. **Inkubazzjoni**

Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitgħattew b'tap li tgħaddi minnu l-arja. Ir-reċipjenti jiġu mħawwda u mqiegħda f'apparat ta' culturing. Matul it-test huwa meħtieġ li l-alke jinżammu f'sospensjoni u sabiex tiffaċilita trasferiment ta' CO_2. Għal dan il-għan, għandu jintuża ċaqliq u taħwid kostanti. Il-koltivazzjonijiet għandhom jiġu miżmuma b'temperatura fl-isfera ta' 21 sa 24 °C, ikkontrollati b' ± 2 °C. Għal speċi oħra minbarra dawk imniżżla fl-Appendiċi 1, eż. speċi tropikali, temperaturi ogħla jistgħu jkunu xierqa, jekk il-kriterju ta' validità jista' jkun milħuq. Huwa rakkomandat li l-fliexken jitpoġġew kif ġie ġie u li jerġgħu jitpoġġew ta' kuljum fl-inkubatur.

▼M1

Il-pH tal-midjum ta’ kontroll ma għandux jiżdied b’aktar minn 1.5 unità matul it-test. Għal metalli u komposti li jonizzaw parzjalment b’pH madwar il-pH tat-test, jista’ jkun meħtieġ li d-differenza fil-pH tiġi limitata sabiex jinkisbu riżultati reproduċibbli u mfissra sew. Differenza ta’ < 0.5 pH unità hija teknikament fattibbli u tista’ tiġi miksuba billi tiġi żgurata rata ta’ trasferiment ta’ massa ta’ CO_2 adegwata mill-arja tal-madwar tas-soluzzjoni tat-test, eż. billi tiżdied ir-rata taċ-ċaqlieq. Possibilità oħra hija li titnaqqas id-domanda għal CO_2 billi titnaqqas il-bijomassa tal-bidu jew it-tul tat-test.

Il-wiċċ fejn il-koltivazzjonijiet huma inkubati għandu jirċievi illuminazzjoni fluworexxenti kontinwa u uniformi eż. ta’ dawl tat-tip “cool-white” jew “daylight”. Razez ta’ alke u ċanobatterji jvarjaw fir-rekwiżiti tagħhom ta’ dawl. L-intensità tad-dawl għandha tintgħażel sabiex taqbel mal-organiżmu tat-test li jintuża. Għall-ispeċi rakkomandata ta’ alka ħadra, l-intensità tad-dawl fil-livell tas-soluzzjonijiet tat-test għandha tintgħażel mill-isfera ta’ 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$meta mkejla fl-isfera ta’ frekwenza effettiva fotosintetikament ta’ 400-700 nm meta jintuża riċevitur xieraq. Għadd ta' speċi, b’mod partikolari *Anabaena flos-aquae*, jikbru sewwa f’inqas intensitajiet ta’ dawl u jistgħu jġarrbu ħsarat f’intensitajiet għolja. Għal dawn l-ispeċi għandha tintgħażel intensità ta’ dawl medja fl-isfera ta’ 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Għal għodod li jkejjlu d-dawl kalibrati f’lux, gamma ekwivalenti ta’ 4 440-8 880 lux għal dawl cool white tikkorrispondi approssimattivament għall-intensità ta’ dawl rakkomandata ta' 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). L-intensità ta’ dawl ma għandiex tvarja aktar minn ± 15 % mill-intensità ta’ dawl medja fuq l-arja ta’ inkubazzjoni.

1.8.10. **Dewmien tat-test**

Id-dewmien tat-test normalment huwa ta' 72 siegħa. Però, żminijiet tat-test itwal jew iqsar jistgħu jiġu użati, dejjem jekk il-kriterji ta’ validità fit-taqsima 1.7 jistgħu jintlaħqu.

1.8.11. **Kejl u determinazzjonijiet analitiċi**

Il-bijomassa tal-alka f’kull flixkun hija determinata tal-inqas ta’ kuljum matul il-perjodu tat-test. Jekk il-kejl huwa magħmul fuq volumi żgħar imneħħija mis-soluzzjoni tat-test permezz tal-pipetta, dawn ma għandhomx jinbidlu.

Kejl tal-bijomassa huwa magħmul bil-għadd manwali taċ-ċelloli permezz ta’ mikroskopju jew apparat elettroniku li jgħodd il-partiċelli (permezz ta’ għadd ta’ ċelloli/jew bijovolum). Teknikajiet alternattivi, eż. fluss ta’ cytometry, fluworexxenza in vitro jew in vivo chlorophyll 6)(7), jew densità ottika jistgħu jintużaw jekk korrelazzjoni li tagħti sodisfazzjon mal-bijomassa tista’ tiġi ppruvata fuq l-isfera tal-bijomassa li tiġri fit-test.

Il-pH tas-soluzzjonijiet għandu jiġi mkejjel fil-bidu u fl-aħħar tat-test.

Jekk il-proċedura analitika għad-determinazzjoni tas-sustanza tat-test fl-isfera ta’ konċentrazzjoni użata hija disponibbli, is-soluzzjonijiet tat-test għandhom jiġu analizzati sabiex il-konċentrazzjonijiet inizjali u ż-żamma tal-konċentrazzjonijiet esposti matul it-test jiġu vverifikati.

▼M1

Analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fl-aħħar tat-test tat-test ta' konċentrazzjoni għolja u baxxa, u konċentrazzjoni madwar il-mistennija EC_{50} tista' tkun suffiċjenti fejn x'aktarx il-konċentrazzjonijiet esposti jvarjaw inqas minn 20 % mill-valuri nominali matul it-test. Analiżi tal-konċentrazzjonijiet kollha tat-test fil-bidu u fl-aħħar tat-test hija rakkomandata fejn konċentrazzjonijiet x'aktarx ma jibqgħux fil-80-120 % ta' nominali. Għal sustanzi tat-test li huma volatili, instabbli jew li jitferrxu ħafna, ikkampjunar addizzjonali għal analiżi b'intervalli ta' 24 siegħa matul il-perjodu ta' esponiment huwa rakkomandat sabiex jiġi mfisser aħjar it-telf tas-sustanza tat-test. Għal dawn is-sustanzi, repliki żejda jkunu meħtieġa. F'kull każ, determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hemm bżonnha biss fi flixkun replikat f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew fuq il-kontenut tal-fliexken miġjuba mir-replika).

Midja tat-test ippreparati speċifikatament għall-analiżi ta' konċentrazzjonijiet esposi matul it-test għandhom jiġu ittrattati b'mod identiku għal dawk użati sabiex isiru t-testijiet, i.e. għandhom jiġu mlaqqmin b'alke u inkubati taħt kundizzjonijiet identiċi. Jekk analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test maħlula hija meħtieġa, jista' jkun neċessarju li l-alke jiġu sseparati minn mal-midjum. Separazzjoni għandha preferibbilment tkun magħmula permezz ta' ċentrifugazzjoni b'g-force baxxa, suffiċjenti sabiex tissettja l-alke.

Jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanzi li jkunu ittestjati ġiet miżmuma, b'mod sodisfaċenti, f'± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew imkejla inizjalment, matul it-test, analiżi tar-riżultati tista' tkun bażata fuq valuri inizjali jew imkejla inizjalment. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni nominali jew imkejla inizjalment hija akbar minn ± 20 %, analiżi tar-riżultati għandha tkun bażata fuq medja ġeometrika matul l-esponiment jew fuq mudelli li jiddeskrivu n-nuqqas tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (3)(8).

It-test ta' inibizzjoni ta' tkabbir ta' alka hija sistema iktar dinamika ta' ttestjar minn ħafna testijiet ta' tossiċità tal-ilma ta' żmien qasir. Bħala konsegwenza, il-konċentrazzjonijiet attwalment esposti jistgħu jkunu diffiċili sabiex jiġu mfissra, speċjalment għas-sustanzi li jinfirxu li jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. F'dawn il-każijiet, jekk is-sustanza ma tibqax tidher mis-soluzzjoni permezz ta' tifrix għal bijomassa tal-alka li dejjem tiżdied ma tfissirx li hija mitlufa mis-sistema tat-test. Meta r-riżultat tat-test jiġi analizzat, għandu jigi ċcekkjat jekk nuqqas fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test matul it-test huwa akkumpanjat min-nuqqas f'inibizzjoni ta' tkabbir. Jekk dan huwa l-każ, applikazzjoni ta' mudell xieraq li jiddeskrivi n-nuqqas ta' konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (8) jista' jiġi kkunsidrat. Jekk le, jista' jkun xieraq li l-analiżi tar-riżultati tista' tiġi bbażata fuq il-konċentrazzjonijiet inizjali (nominali jew imkejla).

1.8.12. **Osservazzjonijiet oħra**

Osservazzjoni mikroskopika għandha tiġi magħmula sabiex tiġi vverifikata apparenza normali u f'saħħitha tal-koltivazzjoni mlaqqma u sabiex tiġi osservata xi apparenza anormali tal-alke (kif tista' tiġi kkawżata permezz ta' esponiment għas-sustanza tat-test) fl-aħħar tat-test.

▼M1

1.8.13. **Test tal-limitu**

Taħt ċerti ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza tat-test ma għandhiex effetti tossiċi f'konċentrazzjionijiet sa 100 $mg \cdot l^{-1}$ jew sal-limitu li tinħall fil-midjum tat-test (liema wieħed huwa l-anqas), test ta' limitu li jinvolvi paragun ta' risposti fi grupp ta' kontroll u grupp wieħed ta' trattament (100 $mg \cdot l^{-1}$ jew konċentrazzjoni li taqbel mal-limitu ta' solubilità), jista' jsir. Huwa rakkomandat ħafna li dan għandu jkun imsaħħaħ b'analiżi tal-konċentrazzjoni ta' esponiment. Il-kundizzjonijiet tat-test kollha deskritti qabel u l-kriterji ta' validità japplikaw għal test ta' limitu, bleċċezzjoni li l-għadd ta' repliki ta' trattament irid ikun minn tal-inqas sitta. Ir-risposti varjabbli fil-grupp ta' kontroll u ta' trattament jiġu analizzati permezz tat-test statistiku sabiex jiġu pparagunati medji, eż. Student's t-test. Jekk varjazzjonijiet ta' żewġ gruppi ma humiex l-istess, għandu jsir it-test irranġat għal varjazzjonijiet li ma humiex egwali.

1.8.14. **Modifika għal sustanzi b'kulur qawwi**

L-irradjazzjoni (l-intensità tad-dawl) għandha tkun qrib l-ogħla limitu tal-firxa stabbilita f'dan il-Metodu ta' Ttestjar: 120μE m^{-2} s^{-1} jew ogħla.

Il-linja tad-dawl għandha titqassar billi jitnaqqas il-volum tas-soluzzjonijiet tat-test (fil-firxa ta' 5-25 ml).

Għandu jitwettaq ċaqliq suffiċjenti (pereżempju billi wieħed iħawwad b'mod moderat) sabiex tintlaħaq frekwenza għolja ta' esponiment tal-alka għal irradjazzjoni għolja fis-superfiċje tal-kultura.

2. **DEJTA**

2.1. PLOTTJAR TA' KURVI TA' TKABBIR

Il-bijomassa fir-riċipjenti tat-test tista' tiġi espressa f'unità tal-parametru tas-sostituzzjoni użata għall-kejl (eż. L-għadd ta' ċelloli, il-fluworexxenza).

Qassam f'forma tabulari l-konċentrazzjoni stmata tal-bijomassa f'koltivazzjonijiet tat-test u kontroll flimkien mal-konċentrazzjonijiet tal-materjal tat-test u l-ħinijiet tal-kejl, reġistrati b'riżoluzzjoni minn tal-inqas sieġħat sħaħ, sabiex tipproduċi plottijiet ta' kurvi ta' tkabbir. Kemm skali logaritmiċi u skali lineari jistgħu jkunu bżonnjuża f'dan l-istadju, imma skali logaritmiċi huma obbligatorji u ġeneralment jagħtu preżentazzjoni aħjar ta' varjazzjonijiet fil-mudell ta' tkabbir matul il-perjodu tat-test. Ta' min jinnota li t-tkabbir esponenzjali jipproduċi linja dritta meta pplottjat fuq skala logaritmika, u li l-inklinazzjoni tal-linja (niżla) tindika r-rata speċifika ta' tkabbir.

Permezz tal-plots, eżamina jekk il-koltivazzjonijiet ta' kontroll jikbrux esponenzjalment bir-rata mistennija matul it-test. Eżamina, b'mod kritiku l-punti kollha tad-dejta u l-apparenza tal-graffs, u ċċekkja d-dejta oriġinali u l-proċeduri għal żbalji possibbli. Iċċekkja b'mod partikolari kwalunkwe punt dwar dejta li tidher li tiddevja bi żball sistematiku. Jekk huwa ovvju li żbalji proċedurali jistgħu jiġu identifikati u/jew ikkunsidrati probabbli, il-punt tad-dejta speċifiku jiġi mmarkat bħala iżolat u ma huwiex inkluż f'analiżi statistika sussegwenti. (Konċentrazzjoni ta' alka ta' żero f'wieħed minn tnejn jew tliet reċipjenti replikati jistgħu jindikaw li r-reċipjent ma ġiex mlaqqam kif suppost, jew ma kienx imnaddaf b'mod xieraq. Raġunijiet għal ċaħda ta' punt ta' dejta bħala iżolat iridu jiġu mniżżla b'mod ċar fir-rapport tat-test. Raġunijiet aċċettati huma biss (rari) żbalji proċedurali u mhux sempliċement preċiżjoni ħażina. Proċeduri ta' statistiċi għall-identifikazzjoni ta' punti iżolati huma ta' użu limitat f'dan it-tip ta' problema u ma jistgħux jissostitwixxu ġudizzju ta' espert. Punti iżolati (immarkati bħala tali) għandhom preferibbilment jinżammu qalb il-punti tad-dejta fi kwalunkwe preżentazzjoni sussegwenti ta' dejta grafika jew tabulari.

▼M1

2.2. VARJABBLI TA' RISPONS

L-għan tat-test huwa li jiġu ddeterminati l-effetti tas-sustanza tat-test fuq it-tkabbir tal-alke. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli ta' rispons, għax pajjiżi membri għandhom preferenzi u bżonnijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu applikabbli fil-pajjiżi membri kollha, l-effetti għandhom jiġu evalwati billi jintużaw iż-żewġ varjabbli ta' rispons (a) u (b) deskritti hawn taħt.

(a) Rata medja ta' tkabbir speċifiku: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkulat fuq il-bażi taż-żieda logaritmika tal-bijomassa matul il-perjodu tat-test, espress bil-ġurnata.

(b) Prodott: dan il-varjabbli ta' rispons hija l-bijomassa fl-aħħar tat-test b'nuqqas tal-bijomassa inizjali.

Għall-applikazzjoni ta' dan il-metodu fi ħdan il-qafas regolatorju tal-UE, il-kalkolu tar-riżultati għandu jkun ibbażat fuq medja ta' rata ta' tkabbir speċifika għar-raġunijiet deskritti hawn taħt. Għandu jiġi nnutat li valuri ta' tossiċità kkalkulati billi jintużaw dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma humiex paragunabbli u din id-differenza trid tiġi rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq rata medja ta' tkabbir speċifika (E_rC_x) ġeneralment ikunu ogħla mir-riżultati bbażati fuq prodott (E_yC_x) jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-Metodu tat-test jiġu osservati, minħabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Dan ma għandux jiġi interpretat bħala differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, imma sempliċement li l-valuri huma differenti matematikament. Il-kunċett ta' rata medja ta' tkabbir speċifiku hija bażata fuq il-mudell ġenerali ta' tkabbir esponenzjali ta' alke f'koltivazzjonijiet mhux limitati, fejn it-tossiċità hija stmata fuq il-bażi tal-effetti tar-rata ta' tkabbir, mingħajr ma hija dipendenti fuq il-livell assolut tar-rata speċifika ta' tkabbir tal-kontroll, fuq in-niżla tal-kurva tal-konċentrazzjoni-rispons jew fuq id-dewmien tat-test. B'kuntrast, riżultati bażati fuq ir-rispons varjabbli tal-prodott huma dipendenti fuq dawn il-varjabbli l-oħra. E_yC_x huwa dipendenti fuq ir-rata speċifika ta' tkabbir tal-ispeċi ta' alka użata fit-test u fuq ir-rata massima ta' tkabbir speċifiku li tista' tvarja bejn speċijiet u kif ukoll bejn razez differenti ta' alka. Dan il-varjabbli ta' rispons ma għandux jiġi użat sabiex jipparaguna s-sensittività mat-tossiċi qalb l-ispeċi ta' alka jew kif ukoll razez differenti. Fil-waqt li l-użu ta' rata medja ta' tkabbir speċifiku sabiex tiġi stmata t-tossiċità huwa xjentifikament ippreferut, stimi ta' tossiċità bażati fuq prodott huma inklużi wkoll f'dan il-Metodu tat-test sabiex jiġu sodisfatti rekwiżiti regolatorji tal-mument f'ċertu pajjiżi.

2.2.1. **Rata medja ta' tkabbir**

Ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku għal perjodu speċifiku hija kkalkulata bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa mill-ekwazjoni għal kull reċipjent singolu ta' kontrolli u trattamenti:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (ġurnata}^{-1}\text{)}$$

fejn:

μ_{i-j}: hija r-rata medja speċifika ta' tkabbir minn ħin *i* sa *j*;

X_i: hija l-bijomassa fil-ħin *i*;

X_j: hija l-bijomassa fil-ħin *j*;

▼M1

Għal kull grupp ta' trattament u grupp ta' kontroll, ikkalkula valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi ta' varjazzjoni.

Ikkalkula rata medja speċifika ta' tkabbir fuq id-dewmien tat-test kollu (normalment ġranet 0-3), permezz ta' użu ta' bijomassa mlaqqma bħala l-valur tal-bidu minflok valur imkejjel tal-bidu, għax b'dan il-mod normalement tinkiseb preċiżjoni akbar. Jekk l-apparat użat għal kejl tal-bijomassa jħalli determinazzjoni biżżejjed preċiża tal-bijomassa mlaqqma baxxa (eż. cytometer ta' fluss) allura l-konċentrazzjoni tal-bijomassa mkejla fil-bidu tista' tiġi użata. Ivvaluta wkoll ir-rata ta' tkabbir sezzjoni b'sezzjoni, ikkalkulati bħala r-rati ta' tkabbir speċifiku f'kull ġurnata matul il-kors tat-test (ġranet 0-1, 1-2 u 2-3) u eżamina jekk ir-rata ta' kontroll ta' tkabbir tibqax kostanti (ara l-kriterji ta' validità, sezzjon 1.7). Rata ta' tkabbir speċifiku sinjifikatament aktar baxxa fl-ewwel ġurnata mir-rata medja totali ta' tkabbir speċifiku tista' tindika fażi ta' dewmien. Fil-waqt li fażi ta' dewmien tista' tiġi minimizzata u prattikament eliminata f'koltivazzjonijiet ta' kontroll permezz ta' propagazzjoni xierqa tal-prikoltivazzjoni, fażi ta' dewmien f'koltivazzjonijiet esposti tista' tindika rkupru wara stress tossiku inizjali jew esponiment mnaqqsa minħabba telf tas-sustanza tat-test (li tinkludi assorbiment fil-bijomassa tal-alka) wara esponiment inizjali. Għalhekk ir-rata ta' tkabbir sezzjoni b'sezzjoni tista' tiġi assessjata sabiex jiġu vvalutati l-effetti tas-sustanza tat-test li jiġru matul il-perjodu ta' esponiment. Differenzi sostanzjali bejn r-rata ta' tkabbir sezzjoni b'sezzjoni u r-rata medja ta' tkabbir jindikaw devjazzjoni minn tkabbir esponenzjali kostanti u li eżaminazzjoni mill-qrib tal-kurvi ta' tkabbir hija meħtieġa.

Ikkalkula l-persentaġġ ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir għal kull replika ta' trattament mill-ekwazjoni:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

fejn:

$\%I_r$: persentaġġ ta' inibizzjoni f'rata medja ta' tkabbir speċifiku;

μ_C: valur medju għal rata medja ta' tkabbir speċifiku (μ) fil-grupp ta' kontroll;

μ_T: rata medja ta' tkabbir speċifiku għar-replika ta' trattament;

Meta solventi huma użati sabiex jiġu ppreparati soluzzjonijiet tat-test, il-kontrolli tas-solventi minflok il-kontrolli mingħajr solventi għandhom ikunu użati fil-kalkulazzjoni tal-persentaġġ ta' inibizzjoni.

2.2.2. **Prodott**

Il-prodott huwa kkalkulat bħala l-bijomassa fl-aħħar tat-test li minnu titnaqqas l-bijomassa tal-bidu għal kull reċipjent singolu ta' kontrolli u trattamenti. Għal kull test ta' konċentrazzjoni u kontroll, ikkalkula valur medju għall-prodott flimkien mal-istimi ta' varjazzjoni. Il-persentaġġ ta' inibizzjoni fil-prodott ($\%I_y$) jista' jiġi kkalkulat għal kull replika ta' trattament kif ġej:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

fejn:

$\% I_y$: persentaġġ ta' inibizzjoni ta' prodott;

Y_C: valur medju għall-prodott fil-grupp ta' kontroll;

Y_T: valur għall-prodott għar-replika ta' trattament.

2.3. PLOTTJAR TA' KURVA TA' RISPONS TA' KONĊENTRAZZJONI

Ipplottja l-persentaġġ ta' inibizzjoni kontra l-logaritmu tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u eżamina l-plot mill-qrib, mingħajr ma tagħti każ ta' xi punt ta' dejta li ġie maqtugħ waħdu bħala iżolat fl-ewwel faži. Daħħal linja lixxa min-nofs il-punti ta' dejta fuq l-għajn jew permezz ta' interpolazzjoni kompjuterizzata sabiex tieħu l-ewwel impressjoni tar-relazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' rispons, imbagħad ipproċedi b'metodu aktar dettaljat, preferibbilment metodu ta' statistika kompjuterizzata. Skont l-użu intiż tad-dejta, il-kwalità (preċiżjoni) u l-ammont ta' dejta, kif ukoll id-disponibblità ta' għodda ta' analiži tad-dejta, jista' jiġi deċiż (u xi drabi ġġustifikat sew) li titwaqqaf l-analiži tad-dejta f'dan l-istadju u sempliċement jinqraw il-figuri prinċipali EC_{50} u EC_{10} (u/jew EC_{20}) mill-kurva mdaħħla fuq l-għajn (ara wkoll it-taqsima ta' hawn taħt fuq effetti stimulatorji). Raġunijiet valida għax ma jintużax metodu statistiku jistgħu jinkludu:

— Dejta ma hijiex xierqa għal metodi kompjuterizzati sabiex tipproduċi riżultati li aktar tista' torbot fuqhom milli jistgħu jiġu ottenuti minn ġudizzju espert — f'tali sitwazzjonijiet xi programm ta' kompjuter jistgħu anke jfallu li jipproduċu soluzzjoni li tista' turbot fuqha (ripetizzjonijiet jistgħu ma jaqblux eċċ.)

— Reazzjonijiet ta' tkabbir stimulatorji ma jistgħux jiġu mmaniġġjati adegwatament permezz tal-użu ta' programmi ta' kompjuter li huma disponibbli (ara taħt).

2.4. PROĊEDURI STATISTIĊI

L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons kwantitattivà permezz ta' analiži ta' regressjoni. Huwa possibbli li tintuża regressjoni lineari li hija mogħtija piż wara li d-dejta ta' rispons tiġi trasformata b'mod lineari — pereżempju f'unità probit jew logit jew Weibull (9), imma proċeduri ta' rigressjoni li mhumiex lineari, huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet fid-dejta li ma jistgħux jiġu evitati u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet lixxi. Meta viċin iż-żero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistgħu jiġu mkabbra bit-trasformazzjoni, li tinterferi mal-analiži (9). Ta' min jinnota li metodi standard ta' analiži permezz ta' użu ta' trasformazzjonijiet probit, logit, jew Weibull huma maħsuba għall-użu fuq dejta quantal (eż. mortalità jew sopravvivenza), u jridu jiġu mmodifikati sabiex jakkomodaw tkabbir jew dejta fuq il-bijomassa. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn dejta kontinwa jinsabu f'(10)(11) u (12). L-użu ta' analiži ta' rigressjoni mhux lineari hiwa spjegat f'aktar dettall fl-Appendiċi 4.

▼M1

Għal kull varjabbli ta' rispons li għandu jiġi analizzat, uża ir-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons sabiex tikkalkula punt ta' stimi ta' valuri EC_x. Meta possibbli, il-limiti ta' 95 % kunfidenza għal kull stima għandhom jiġu ddeterminati. Id-dħul sewwa tad-dejta ta' rispons mal-mudell ta' rigressjoni għandu jiġi vvalutat jew grafikament jew statistikament. Analiżi ta' rigressjoni għandha tkun magħmula permezz tal-użu ta' reazzjonijiet ta' repliki individwali, mhux b'midja ta' grupp ta' trattament. Jekk, però, id-dħul ta' kurva mhux lineari huwa diffiċli jew ifalli minħabba sparpaljar kbir fid-dejta, il-problema tista' tiġi evitata billi ssir ir-regressjoni fuq midja ta' grupp bħala mod prattiku sabiex titnaqqas l-influwenza ta' iżolati suspetti. L-użu ta' din l-għażla għandu jiġi identifikat fir-rapport tat-test bħala devjazzjoni mill-proċedura normali għaliex il-qbil tal-kurva ma' repliki individwali ma pproduċewx riżultat tajjeb.

Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu jiġu wkoll miksuba permezz tal-użu ta' interpolazzjoni lineari b'bootstrapping (13), jekk mudelli/metodi disponibbli ta' rigressjoni mhumiex tajbin għad-dejta.

Għal stima tal-LOEC u għalhekk l-NOEC, u għal effetti tas-sustanza tat-test fuq ir-rata ta' tkabbir, huwa neċessarju li jsir paragun tal-midja ta' trattament permezz tal-użu ta' analiżi ta' tekniki ta' varjazzjoni (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni trid imbagħad tiġi pparagunata mal-medja ta' kontroll permezz ta' metodu tat-test xieraq ta' paragun multiplu jew trend. It-test ta' Dunnett jew Williams jista' jkun ta' għajnuna (14)(15)(16)(17)(18). Huwa neċessarju li tivvaluta jekk l-assunzjoni ta' omoġeneità ta' varjazzjoni ANOVA treġix. Din il-valutazzjoni tista' tiġi magħmula grafikament jew b'test formali (18). Testijiet xierqa huma dawk ta' Levene jew Bartlett. Nuqqas li tintlaħaq l-assunzjoni ta' omoġeneità ta' varjazzjonijiet tista' xi drabi tiġi korretta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk eteroġeneità ta' varjanza hija estrema u ma tistax tiġi korretta bi trasformazzjoni, analiżi b'metodi bħal step-down Jonkheere trend tests għandha tiġi kkunsidrata. Gwida addizzjonali għad-determinazzjoni tal-NOEC tinstab f'(12).

Żviluppi xjentifiċi reċenti wasslu għal rakkomandazzjoni sabiex jiġi abbandunat il-kunċett ta' NOEC u jinbidel b'punti ta' stima bbażati fuq regressjoni EC_x. Valur xieraq għal x ma ġiex stabbilit għal dan it-test tal-alka. Sfera ta' 10 sa 20 % tidher li hija xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment kemm l-EC_{10} u l-EC_{20} għandhom jiġu rrappurtati.

2.5. STIMULAZZJONI TA' TKABBIR

Stimulazzjoni ta' tkabbir (inibizzjoni negattiva) f'konċentrazzjonijiet baxxi hija xi drabi osservata. Din tista' tirriżulta jew minn hormesis ("stimulazzjoni tossika") jew minnn żieda ta' fatturi stimulanti ta' tkabbir mal-materjal tat-test għall-inqas midjum użat. Innota li ż-żieda ta' nutrijenti inorganiċi ma għandux ikollha effett dirett għaliex il-midjum tat-test għandu jżomm żieda ta' nutrijenti matul it-test. Stimulazzjoni f'doża baxxa tista' ġeneralment tiġi injorata f'kalkulazzjonijiet EC_{50} sakemm ma tkunx estrema. Madankollu, jekk hija estrema, jew valur EC_x għal x baxxa għandu jiġi kkalkulat, proċeduri speċjali jistgħu ikunu meħtieġa. Tħassir ta' reazzjonijiet stimulatorji mill-analiżi tad-dejta għandhom jiġu evitati jekk possibbli, u jekk software disponibbli li jdaħħal il-kurva ma jistax jaċċetta stimulazzjoni minuri, tista' tintuża interpolazzjoni lineari b'bootstrapping. Jekk l-istimulazzjoni hija estrema, l-użu ta' mudell ta' hormesis jista' jiġi kkunsidrata (19).

▼M1

2.6. INIBIZZJONI TA' TKABBIR MHUX TOSSIKU

Materjali tat-test li jassorbu d-dawl jistgħu jagħtu lok għal tnaqqis fir-rata ta' tkabbir għaliex id-dellijiet inaqqsu l-ammont ta' dawl disponibbli. Tali tipi ta' effetti fiżiċi għandhom ikunu separati minn effetti tossiċi b'modifikazzjoni fil-kundizzjonijiet tat-test u tal-ewwel għandhom jiġu rappurtati separatament. Gwida tinstab f'(2) u (3).

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Il-perjodu tat-test irid jinkludi dan li ġej:

Sustanza tat-test:

— natura fiżika u proprjetajiet relevanti fiżjokemikali, li jinkludu limitu ta' solubilità fl-ilma,

— dejta għall-identifikazzjoni tal-kimika, li tinkludi purità.

Speċi tat-test:

— ir-razza, min jipprovdi jew sors u l-kundizzjonijiet ta' koltivazzjoni użati.

Kundizzjonijiet tat-test:

— dejta tal-bidu tat-test u d-dewmien tiegħu,

— deskrizzjoni tad-disinn tat-test: reċipjenti tat-test, il-volumi tal-koltivazzjonijiet, densità tal-bijomassa fil-bidu tat-test,

— kompożizzjoni tal-midjum,

— konċentrazzjonijiet u repliki tat-test (eż. Għadd ta' repliki, għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test u progressjoni ġeometrika li ġiet użata),

— deskrizzjoni tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test, li tinkludi l-użu ta' materjali li jdewwbu eċċ.,

— apparat ta' culturing,

— intensità ta' dawl u kwalità (sors, omoġenità),

— temperatura,

— konċentrazzjonijiet ittestjati: il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali u kwalunkwe riżultat ta' analiżi sabiex tiddetermina l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fir-reċipjent tat-test. L-effiċjenza ta' rkupru tal-metodu u l-limitu ta' kwantifikazzjoni fil-matriċi tat-test għandhom ikunu rappurtati,

— kwalunkwe devjazzjoni minn dan il-Metodu ta' Ttestjar,

— metodu ta' determinazzjoni tal-bijomassa u evidenza ta' korrelazzjoni bejn il-parametru mkejjel u l-piż niexef.

Riżultati:

— valuri pH fil-bidu u fl-aħħar tat-test għal kull trattament,

— bijomassa għal kull flixkun f'kull punt ta' kejl u metodu sabiex titkejjel il-bijomassa,

▼M1

— kurvi ta’ tkabbir (plot ta' bijomassa kontra ħin),

— varjabbli ta’ rispons kkalkulati għal kull trattament replikat, b’valuri medji u koeffiċjent ta’ varjazzjoni għar-repliki,

— preżentazzjoni grafika tar-relazzjoni konċentrazzjoni/effett,

— stimi ta’ tossiċità varjabbli ta’ rispons eż. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} u intervalli ta’ kunfidenza assoċjati. Jekk ikkalkulati, LOEC u NOEC u l-metodi ta’ statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom,

— jekk ANOVA ġiet użata, id-daqs tal-effett li jista’ jiġi skopert (eż. Id-differenza l-inqas sinifikanti),

— kwalunkwe stimulazzjoni ta’ tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament,

— kwalunkwe effett ieħor osservat, eż. bidliet morfoloġiċi tal-alke,

— diskussjoni tar-riżultati, li jinkludu kwalunkwe influwenza fuq ir-riżultat tat-test li tirriżulta minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta’ Ttestjar.

4. **LETTERATURA**

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Ċanobatterji, Growth Inhibition Test

(2) ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442

(3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

(4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

(5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692

(6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531.

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079.

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

▼**M1**

(10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

(11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

(12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121

(15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M1

Appendiċi 1

Razez li ġie ppruvat li huma adattati għat-test

Alke ħodor

— *Pseudokirchneriella subcapitata*, (qabel magħrufa bħala *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (qabel magħrufa bħala *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatomi

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Ċanobatterji

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sorsi tar-razez

Ir-razez rakkomandati huma disponibbli f'koltivazzjonijiet unialkali mill-kollezzjonijiet li ġejjin (f'ordni alfabetiku):

ATCC: Kollezzjoni ta' Koltivazzjoni ta' Tip Amerikan

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

USA

CCAP, Kollezzjoni ta' Koltivazzjoni ta' Alke u Protożoa

Istitut ta' Ekoloġija tal-Ilma Ħelu,

Laboratorju Windermere

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

UK

SAG: Kollezzjoni ta' Koltivazzjonijiet ta' Alka

Istitut tal-Fisjoloġija tal-Pjanti

Università ta' Göttingen

Nicholausberger Weg 18

D-3400 Göttingen

GERMANY

UTEX Kollezzjoni ta' koltivazzjoni ta' Alke

Sezzjon ta' Bijoloġija Molekolari, Ċellulari u ta' Żvilupp

Skola tax-Xjenzi Bijoloġiċi

l-Università tat-Texas f'Austin

Austin, Texas 78712

USA

▼M1

Apparenza u karatteristiċi tal-ispeċijiet rakkomandati

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Apparenza	Mgħawwġa, ċelloli singoli mibruma	Ovali, fil-parti l-kbira ċelloli singoli	virgi	Ktajjen ta' ċelloli ovali	virgi
Daqs (L × W) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volum ta' ċelloli(μm^3/ċell)	40-60 (1)	60-80 (1)	40-50 (1)	30-40 (1)	2,5 (2)
Piż niexef taċ-ċelloli(mg/ċell)	2-3 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	3-4 × 10^{-8}	1-2 × 10^{-8}	2-3 × 10^{-9}
Rata ta' tkabbir (1) ($ġurnata^{-1}$)	1,5-1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

(1) Imkejla b'apparat li jgħodd partiċelli elettroniċi
(2) Ikkalkulat mid-daqs
(3) Rata ta' tkabbir osservata l-aktar ta' spiss f'midjum OECD f'intensità ta' dawl ta'madwar 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ u 21 °C

Rakkomandazzjonijiet speċifiċi fuq Culturing u l-Immaniġġjar ta' Speċi tat-test Rakkomandati

Pseudokirchneriella subcapitata u Desmodesmus subspicatus

Dawn l-alke ħodor huma ġeneralment faċli biex iżżommhom f'diversi midja ta' koltivazzjoni. Informazzjoni fuq midja xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' koltivazzjoni. Iċ-ċelloli huma normalment solitarji, u kejl tad-densità taċ-ċelloli jista' faċilment jiġi magħmul permezz ta' apparat li jgħodd partiċelli elettroniċi jew mikroskopju.

Anabaena flos-aquae

Midja ta' tkabbir varji jistgħu jiġu użati biex tinżamm koltivazzjoni ta' stokk. Huwa partikolarment importanti li jiġi evitat li l-koltivazzjoni titħalla tgħaddi l-fażi ta' tkabbir tal-log meta tiġi mġedda, rkupru huwa diffiċli f'dan il-punt.

Anabaena flos-aquae tiżviluppa ġabriet ta' ktajjen ta' ċelloli. Id-daqs ta' dawn il-ġabriet jista' jvarja mal-kundizzjonijiet ta' culturing. Jista' jkun neċessarju li jinkisru dawn il-ġabriet meta l-għadd bil-mikroskopju jew permezz ta' apparat li jgħodd il-partiċelli elettroniċi huwa użat għad-determinazzjoni tal-bijomassa.

Sonikazzjoni tas-sub-kampjuni jistgħu jiġu użati biex jinkisru l-ktajjen sabiex titnaqqas il-varjabilità fl-għadd. Sonikazzjoni itwal aktar milli meħtieġ sabiex jinkisru l-ktajjen f'tulijiet aqsar jistgħu jkissru ċ-ċelloli. L-intensità ta' sonikazzjoni u dewmien iridu jkunu identiċi għal kull trattament.

Għodd biżżejjed oqsma fuq il-hemocytometer (tal-anqas 400 ċellola) biex tgħin tikkompensa għal varjabbilità. Dan itejjeb l-attendibilità ta' determinazzjonijiet ta' densità mikroskopiċi.

Apparat li jgħodd il-partiċelli elettroniċi jista' jiġi użat għad-determinazzjoni tal-volum totali ta' ċelloli ta' Anabaena wara li l-ktajjen ta' ċelloli jinkisru b'sonifikazzjoni bil-għaqal. L-enerġija tas-sonifikazzjoni għandha tiġi rranġata sabiex jiġi evitat li l-ktajjen jinqasmu.

Uża ħallât bil-belliegħa jew metodu simili adegwat sabiex tiżgura li s-sospensjoni ta' alke biex ir-riċipjenti tat-test jiġu mlaqqma hija mħallta sew u b'mod omoġenju.

▼**M1**

Kontenituri tat-test għandhom jitqiegħdu fuq mejda orbitali jew ta' ħallit reċiproku b'madwar 150 dawra kull minuta. Alternattiva oħra hija l-użu ta' ċaqlieq intermittenti sabiex titnaqqas it-tendenza ta' Anabaena li tifforma ċapap. Jekk ikun hemm ċapap, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġu ottenuti kampjuni rappreżentattivi tal-kejl tal-bijomassa. Ċaqlieq qawwi qabel ma jittieħdu l-kampjuni jista' jkun neċessarju sabiex jiddiżintegraw ċapap ta' alka.

Synechococcus leopoliensis.

Midja ta' tkabbir varji jistgħu jiġu użati biex tinżamm koltivazzjoni ta' stokk. Informazzjoni fuq midja xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' koltivazzjoni.

Synechococcus leopoliensis tikber bħal ċelloli solitarji b'forma ta' vireg. Iċ-ċelloli huma żgħar ħafna, li jikkomplika l-għadd permezz ta' mikroskopju għal kejl tal-bijomassa. Apparati li jgħoddu l-partiċelli elettroniċi mgħammra sabiex jgħoddu partiċelli sad-daqs ta' madwar 1 μm huma ta' għajnuna. Kejl in vitro fluorometric huma applikabbli ukoll.

Navicula pelliculosa

Midja ta' tkabbir varji jistgħu jiġu użati biex tinżamm koltivazzjoni ta' stokk. Informazzjoni fuq midja xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' koltivazzjoni. Innota li kompost li fih is-silika huwa meħtieġ fil-midjum.

Navicula pelliculosa tista' tifforma gruppi taħt ċerti kundizzjonijiet ta' tkabbir. Minħabba l-produzzjoni ta' lipidi ċ-ċelloli tal-alka xi drabi għandhom it-tendenza li jakkumulaw fil-wiċċ. Taħt dawk ċ-ċirkustanzi, miżuri speċjali jridu jittieħdu meta sub-kampjuni huma meħuda għad-determinazzjoni tal-bijomassa sabiex jiġu miksuba kampjuni rappreżentattivi. Taħlit bil-saħħa, eż. bl-użu ta' ħallât bil-belliegħa, jista' jkun meħtieġ.

▼M1

Appendiċi 2

Midja ta' tkabbir

Wieħed miż-żewġ midja ta' tkabbir li ġejjin jista' jintuża:

Midjum OECD: Midjum oriġinali ta' OECD TG 201, ukoll skont ISO 8692

US. EPA midjum AAP ukoll skont ASTM.

Meta dawn il-midja jiġu ppreparati, kimiċi reaġenti jew ta' grad analitiku għandhom jiġu użati u dejonizzati fl-ilma.

Kompożizzjoni tal-midjum-AAP (US. EPA) u l-midjum OECD TG 201

Komponent	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Il-proporzjon molari ta' EDTA għal ħadid teċċedi bi ftit unità. Dan jipprevjeni l-preċipitazzjoni tal-ħadid u, fl-istess ħin, chelation ta' jonji ta' metalli tqal hija minimizzata.

Fit-test bid-dijatomu Navicula pelliculosa, iż-żewġ midja jridu jkunu supplimentati b' $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ sabiex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 1,4 mg Si/l.

Il-pH tal-midjum jinkiseb f'ekwilibriju bejn is-sistema ta' karbonat tas-sistema tal-midjum u l-pressjoni parzjali tas-CO_2 fl-arja atmosferika. Bejn wieħed u ieħor ir-relazzjoni bejn pH b'25 °C u l-konċentrazzjoni tal-bikarbonat molari hija:

$$PH_{eq} = 11,30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

B'15 mg $NaHCO_3$, pH_{eq} = 7,5 (U.S. EPA midjum) u b'50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8,1 (OECD midjum).

Komposti ta' elementi tal-midja tat-test

Element	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Preparazzjoni tal-midjum OECD

Nutrijent	Konċentrazzjoni f'soluzzjoni ta' stokk
Soluzzjoni ta' stokk nru 1: makronutrijenti	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Soluzzjoni ta' stokk nru 2: ħadid	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Soluzzjoni ta' stokk nru 3: elementi ta' traċċi	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Soluzzjoni ta' stokk nru 4: bikarbonat	
$NaHCO_3$	50 $g \cdot l^{-1}$
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Sterilizza s-soluzzjonijiet ta' stokk permezz ta' filtrazzjoni b'membrana (diametru medju tal-pori 0,2 μm) jew permezz ta' autoclaving (120 °C, 15 min). Erfa' s-soluzzjonijiet fid-dlam b'4 °C.

Tagħmilx autoclave tas-soluzzjonijiet ta' stokk 2 u 4, imma sterilizzahom permezz ta' filtrazzjoni b'membrana.

▼**M1**

Ipprepara midjum ta' tkabbir billi żżid volum xieraq ta' soluzzjonijiet ta' stokk 1-4 mal-ilma

Żid sa 500 ml ta' ilma sterilizzat:

— 10 ml ta' soluzzjoni ta' stokk nru 1

— 1 ml ta' soluzzjoni ta' stokk nru 2

— 1 ml ta' soluzzjoni ta' stokk nru 3

— 1 ml ta' soluzzjoni ta' stokk nru 4

Żid sa 1 000 ml b'ilma sterilizzat

Ħalli ħin biżżejjed sabiex tekwilibrija l-midjum mas-CO_2 atmosferiku, jekk neċessarju b'bubbling b'arja sterili filterjata għal ftit ħin.

Preparazzjoni tal-midjum U.S. EPA

A1.1. Żid ml wieħed ta' kull soluzzjoni stokk fi A1.2.1–A1.2.7 sa bejn wieħed u ieħor 900 mL ta' ilma dejonizzat jew distillat u agħmel dilwizzjoni sa 1L.

A1.2. Soluzzjonijiet stokk ta' makronutrijenti jsiru billi jinħallu dawn li ġejjin fi 500ml ta' ilma dejonizzat jew distillat. Rejaġġenti A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3, u A1.2.4 jistgħu jiġu kkombinati f' soluzzjoni stokk waħda.

A1.2.1. $NaNO_3$— 12,750 g.

A1.2.2. $MgCL_2 \cdot 6H_2O$— 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$— 2,205 g.

A1.2.4. *Soluzzjoni Konċentrata ta' Mikronutrijenti*— (see A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$— 7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4— 0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$— 7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$— Ara n-Nota A1.1.

Nota A1.1-Użu għall-ispeċi diatom ittestjati biss. Jistgħu jiġu miżjuda direttament (202,4 mg) jew permezz tas-soluzzjoni stokk biex jinkiseb 20 mg/L ta' konċentrat finali fil-midjum.

A1.3. Soluzzjonijiet stokk ta' mikronutrijenti jsiru billi jinħallu dawn li ġejjin fi 500ml ta' ilma dejonizzat jew distillat:

A1.3.1. H_3BO_3— 92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$— 207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$— 1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$— 79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$— 0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$— 3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$— 0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$— 150,000 mg.

[Disodium (Ethylenedinitrilo) tetraacetate].

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$— 0,005 mg Ara Nota A1.2.

Nota A1.2 — Uża biss fil-midjum ta' kulturi stokk tal-ispeċi diatom.

A1.4. Altera l-pH sa 7,5± 0,1 permezz ta' 0,1 *N* jew 1,0 *N* NaOH jew HCl.

A1.5. Iffiltra l-midjum f'kontenitur sterilizzat permezz ta' filtru bil-membrane ta' 0,22-µm jekk għandu jintuża midjum li jgħodd il-partiċelli jew filtru 0,45-µm magħandux jintuża.

A1.6. Aħżen il-midjum fid-dlam sa bejn wieħed u ieħor 4 °C sakemm jintuża.

▼M1

Appendiċi 3

Eżempju tal-proċedura għall-culturing tal-alke

Osservazzjonijiet Ġenerali

L-għan ta' culturing fuq il-bażi tal-proċedura li ġejja huwa li jinkisbu koltivazzjonijiet ta' alka għal testijiet ta' tossiċità.

Metodi xierqa jridu jiġu użati sabiex jiġi żgurat li l-koltivazzjonijiet ta' alka ma jkunux infettati minn batteri. Koltivazzjonijiet axenic jistgħu jkunu mixtieqa imma koltivazzjonijiet unialkali jridu jiġu stabbiliti u użati.

L-operazzjonijiet kollha jridu jsiru f'kundizzjonijiet sterili sabiex kontaminazzjoni b'batteri u alke oħra tiġi evitata.

Apparat u materjal

Ara taħt Metodu ta' Ttestjar: Apparat.

Proċeduri għall-kisba ta' koltivazzjonijiet ta' alka

Preparazzjoni ta' soluzzjoni ta' nutrijent (midjum):

Il-melħ kollu tan-nutrijenti tal-midjum huwa ppreparat bħala soluzzjonijiet ta' stokk konċentrati u merfugħa fid-dlam u l-kesħa. Dawn is-soluzzjonijiet huma sterilizzati b'filtrazzjoni jew b'autoclaving.

Il-midjum huwa ppreparat billi jiżdied l-ammont korrett ta' soluzzjoni ta' stokk sabiex jiġi sterilizzat ilma distillat, u dan isir b'attenzjoni biex l-ebda infezzjonijiet ma sseħħ. Għal midjum solidu 0,8 fil-mija ta' agar huwa miżjud.

Koltivazzjoni ta' stokk:

Il-koltivazzjonijiet ta' stokk huma koltivazzjonijiet ta' alka żgħar li regolarment jiġu trasferiti għal midjum ġdid sabiex jaġixxu bħala materjal inizjali tat-test. Jekk il-koltivazzjonijiet ma jintużawx regolarment, dawn jiġu skrezjati fuq tubi ta' agar. Dawn jiġu ttrasferiti f'midjum ġdid tal-anqas darba kull xahrejn.

Il-koltivazzjonijiet ta' stokk jitkabbru fi fliexken konikali li jkun fihom l-midjum xieraq (volum madwar 100 ml). Meta l-alke jiġu inkubati b'20 °C b'illuminazzjoni kontinwa, trasferiment ta' darba f'ġimgħa huwa meħtieġ.

Matul it-trasferiment, ammont ta' koltivazzjoni "antika" hija trasferita b'pipetti sterili fi flixkun ta' midjum frisk, biex ma' speċi li tikber malajr il-konċentrazzjoni inizjali hija madwar 100 darba iżgħar milli fil-koltivazzjoni l-antika.

Ir-rata ta' tkabbir ta' speċi tista' tkun determinata mill-kurva ta' tkabbir. Jekk hija magħrufa, huwa possibbli tistma d-densità f'liema l-koltivazzjoni għandha tkun trasferita għal midjum ġdid. Dan irid isir qabel ma l-koltivazzjoni tilħaq il-faži tal-mewt.

Pre-koltivazzjoni:

Il-pre-koltivazzjoni hija maħsuba sabiex tagħti ammont ta' alke xieraq għat-tilqim ta' koltivazzjonijiet tat-test. Il-pre-koltivazzjoni hija inkubata taħt il-kundizzjonijiet tat-test u użata meta tkun għada qed tikber esponenzjalment, normalment wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' minn jumejn sa 4 ijiem. Meta l-koltivazzjonijiet tal-alka jkun fihom ċelloli deformati jew anormali, dawn iridu jiġu imwarrba.

▼M1

Appendiċi 4

Analiżi ta' dejta b'regressjoni mhux lineari

Kunsiderazzjonijiet ġenerali

Ir-rispons f'testijiet tal-alka u testijiet oħra ta' tkabbir tal-mikrobi — it-tkabbir tal-bijomassa huwa ta' natura varjabbli kontinwu jew metriku — rata ta' proċess jekk rata ta' tkabbir hija użata, u l-integrali tagħha fuq il-ħin jekk il-bijomassa tiġi magħżula. It-tnejn huma referenzjati għar-rispons medja korrispondenti tal-kontrolli repliki li mhux esposti li juru rispons massimu għall-kundizzjonijiet imposti — b'dawl u temperatura bħala fatturi determinanti prinċipali f'test tal-alka. Is-sistema hija mqassma jew omoġenja u l-bijomassa tista' tidher bħala kontinwazzjoni mingħajr konsiderazzjoni taċ-ċelloli individwali. Il-varjazzjoni ta' distribuzzjoni tat-tip ta' rispons għal tali sistema għandha x'taqsam biss ma fatturi sperimentali (deskritti tipikament mil-log-normali jew distribuzzjonijiet normali ta' żball). Dan huwa b'kuntrast għar-reazzjonijiet tipiċi bioassay bi quantal dejta, għal-liema t-tolleranza (tipikament distribwita b'żewġ modijiet) ta' organiżmi individwali hija ta' spiss assunta li hija l-komponenti varjabbli dominanti. Risposti ta' kontroll hawn huma żero jew livell tal-isfond.

Fis-sitwazzjoni li mhix ikkumplikata, ir-rispons normalizzat jew relattiv, r, jonqos monotonikament minn 1 (inibizzjoni żero) sa 0 (100 fil-mija inibizzjoni). Innota li r-risposti kollha għandhom żball assoċjat, u li inibizzjonijiet negattivi apparenti jistgħu jiġu kkalkulati bħala riżultat ta' żball ta' każwali biss.

Analiżi ta' regressjoni

Mudelli

Analiżi ta' regressjoni timmira li tiddeskrivi kwantitattivament il-kurva konċentrazzjoni-rispons fil-forma ta' funzjoni matematika regressjoni $Y = f(C)$ jew aktar ta' spiss $F(Z)$ fejn $Z = \log C$. Użata inversament $C = f^{-1}(Y)$ tħalli l-kalkolu tal-figuri EC_x li jinkludi l- EC_{50}, EC_{10} u EC_{20}, u l-95 % tagħhom ta' limiti ta' kunfidenza. Diversi forom ta' funzjonijiet sempliċi matematiċi għandhom jiġu ppruvati sabiex jiġu deskritti tajjeb ir-relazzjonijiet konċentrazzjoni-rispons miksuba f'testijiet ta' inibizzjoni ta' tkabbir ta' alka. Funzjonijiet jinkludu, pereżempju, l-ekwazjoni loġistika, l-ekwazjoni mhux simettrika Weibul u l-funzjoni ta' distribuzzjoni log, li huma kollha kurvi bil-forma tal-ittra "S" (sigmoid) li asimptotikalment joqorbu wieħed għal $C \rightarrow 0$, u żero għal $C \rightarrow$ infinità.

L-użu ta' mudelli ta' funzjoni kontinwa threshold (eż. il-mudell Koyman "għall-inibizzjoni tat-tkabbir tal-popolazzjoni" Kooijman et al. 1996) huwa proposta jew alternattiva reċenti għal mudelli asimptotiċi. Dan il-mudell jassumi xejn effetti f'konċentrazzjonijiet taħt ċertu livell, EC0+, li huwa stmat permezz ta' estrapolazzjoni tar-relazzjoni rispons-konċentrazzjoni biex tinterċetta l-bażi ta' konċentrazzjoni permezz tal-użu ta' funzjoni kontinwa li ma hijiex differenzjabbli fil-punt tat-tluq.

Innota li l-analiżi tista' tkun sempliċi minimizzazzjoni tas-somom tal-kwadrati varjabbli (tassumi varjanza kostanti) jew varjati mgħobbija jekk l-eteroġenità tal-varjanza hija kompensata

▼M1

Proċedura

Il-proċedura tista' tiġi mfissra kif ġej: agħżel ekwazjoni xierqa funzjonali, Y = f (C), u adattaha mad-dejta b'regressjoni li mhix lineari. Preferibbilment uża l-kejl minn kull flixkun individwali minflok il-valuri medji tar-replikati, sabiex toħroġ kemm jista' jkun informazzjoni mid-dejta. Jekk il-varjazzjoni hija għolja, fuq in-naħa l-oħra, il-prattika tissuġġerixxi li l-valuri medji tar-repliki jistgħu jipprovdu stima matematika li aktar tista' turbot fuqha, inqas influwenzata bi żbalji sistematiċi fid-dejta, minn ma' kull punt individwali ta' dejta miżmum.

Ipplottja l-kurva adattata u d-data mkejla u eżamina jekk id-dħul tal-kurva huwiex adegwat. Analiżi tar-residwi tista' tkun għodda partikolarment ta' għajnuna għal dan il-għan. Jekk ir-relazzjoni funzjonali magħżula biex iddaħħal r-rispons ta' konċentrazjoni ma tiddeskrivix il-kurva kollha jew xi parti essenzjali tagħha, bħar-rispons f'konċentrazzjonijiet baxxi sewwa, ħu għażla oħra ta' dħul ta' kurva — eż. kurva mhux simettrika bħall-funzjoni Weibul, minflok waħda simettrika. Inibizzjonijiet negattivi jistgħu jkunu problema ma, pereżempju, il-funzjoni ta' distribuzjoni tal-log-normali, li l-istess tiddomanda funzjoni ta' regressjoni alternattiva. Ma huwiex rakkomandat li jiġi assenjat żero jew valur pożittiv żgħir lil tali valuri negattivi għaliex dan jgħawweġ id-distribuzzjoni tal-iżball. Jista' jkun adegwat li jsir dħul ta' kurvi separati fuq partijiet tal-kurva bħall-parti ta' inibizzjoni baxxa sabiex jiġu stmati figuri $EC_{low\ x}$. Ikkalkula mill-ekwazjoni mdaħħla (permezz ta' "estimazzjoni inversa", $C = f^{-1}(Y)$, stimi karatteristiċi ta' punt EC_x's, u rraporta bħala minimu l-EC_{50} u wieħed jew żewġ stimi $EC_{low\ x}$. Esperjenza minn testijiet prattiċi turi li l-preċiżjoni tat-test tal-alka normalment tħalli stima raġonevolment akkurata lejn livell ta' inibizzjoni ta' 10 % jekk punti ta' data huma suffiċjenti — sakemm ma jkunx hemm stimulazzjoni f'konċentrazzjonijiet baxxi bħala fattur li jfixkel. Il-preċiżjoni ta' stima EC_{20} hija ta' spiss konsiderevolment aħjar minn dik ta' EC_{10}, għaliex l-EC_{20} huwa ġeneralment ippożizzjonat fuq il-parti bejn wieħed u ieħor lineari tal-kurva ċentrali konċentrazzjoni rispons. Xi drabi huwa diffiċli li ssir interpretazzjoni ta' EC_{10} minħabba stimulazzjoni ta' tkabbir. Għalhekk, filwaqt li l-EC_{10} hija normalment miksuba b'akkurezza suffiċjenti, huwa wkoll rakkomandat li tirraporta dejjem l-EC_{20}.

Fatturi ta' użin

Il-varjanza esperimentali ma hijiex ġeneralment kostanti u tipikament tinkludi komponent proporzjonali, regressjoni miżuna hija għalhekk b'vantaġġ magħmula b'rutina. L-użin ta' fatturi għal tali analiżi huwa normalment assunt bi proporzjon invers għall-varjanza:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Ħafna programmi ta' regressjoni jħallu l-għażla ta' analiżi ta' regressjoni miżuna ma' fatturi miżuna mniżżla f'tavola. B'mod konvenjenti, l-użin ta' fatturi għandu jiġi normalizzat billi dan jiġi mmultiplikat b'$n/\sum w_i$ (n huwa l-għadd ta' punti ta' dejta) sabiex is-somma tagħhom tiġi wieħed.

Normalizzazzjoni ta' risposti

Normalizzazzjoni bir-rispons medja ta' kontroll tagħti problemi prinċipali u tagħti lok għal struttura ta' varjazzjoni xi ftit ikkumplikata. Bit-tqassim tar-risposti bir-rispons medja ta' kontroll sabiex jinkiseb il-persentaġġ ta' inibizzjoni, wieħed jintroduċi żball addizzjonali ikkawżat bi żball fuq il-medja ta' kontroll. Sakemm dan l-iżball mhuwiex żgħir tant li mhux ta' importanza, l-użin ta' fatturi fil-limiti ta' regressjoni u kunfidenza għandhom jiġu kkoreġuti għal kovarjanza mal-kontroll (17). Innota li preċiżjoni għolja fuq il-rispons medju ta' kontroll stmat hija importanti sabiex titnaqqas il-varjanza totali għar-rispons relattiv. Il-varjanza hija kif ġej:

▼M1

sottoskritt I jirreferi għal-livell ta' konċentrazzjoni i u sottoskritt 0 għall-kontrolli)

$$Y_i = \text{Rispons relattiv} = r_i/r_0 = 1 — I = f(C_i)$$

b'varjanza:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \quad (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

u għax

$$(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0 \text{ u } (\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$$

b'dejta normalment distribwita u m_i u m_0 repliki:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

il-varjanza totali tar-rispons relattiva, Y_i għalhekk issir:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

L-iżball fuq il-medja ta' kontroll huwa inversament proporzjonali għar-radiċi kwadrata tal-għadd tal-medja ta' repliki ta' kontroll u xi drabi jista' jkun ġustifikat li jinkludi dejta storika u b'dan il-mod inaqqas l-iżball bil-kbir. Proċedura alternattiva hija li ma tinnormalizzax d-dejta u ddaħħal ir-risposti assoluti, inkluż id-dejta ta' rispons ta' kontroll, imma li tintroduċi il-valur tar-rispons ta' kontroll bħala parametru addizzjonali sabiex jiġi mdaħħal ma' regressjoni non lineari. B'ekwazjoni tas-soltu ta' regressjoni ta' żewġ parametri, dan il-metodu jeħtieġ għul ta' 3 parametri, u għalhekk jitlob aktar punti ta' dejta milli regressjoni non-lineari fuq dejta li hija normalizzata permezz ta' rispons ta' kontroll li hija ssetjata minn qabel.

Intervalli ta' kunfidenza inversa

Il-kalkulazzjoni ta' intervalli ta' kunfidenza ta' regressjoni li mhix lineari bi stima inversa huma xi ftit ikkomplikati u mhux għażla standard disponibbli f'pakketti ta' programmi ta' statistika ta' kompjuter ordinarju. Limiti ta' kunfidenza approssimattivi jistgħu jiġu miksuba ma' programmi standard ta' regressjoni non-lineari ma' riparametrizzazzjoni (Bruce u Versteeg, 1992), li jinvolvu l-kitba mill-ġdid tal-ekwazjoni matematika bil-punti ta' stima mixtieqa, eż. l-EC_{10} u l-EC_{50} bħala parametri li għandhom jiġu stmati. (Ħalli l-funzjoni tkun I = f' (α, β, konċentrazzjoni) u utilizza r-relazzjonijiet tad-definizzjoni f'(α, β, EC_{10}) = 0.1 u f (α, β, EC_{50}) = 0.5 sabiex tissostitwixxi f'(α, β, konċentrazzjoni) b'funzjoni ekwivalenti g (EC_{10}, EC_{50}, konċentrazzjoni).

Kalkulazzjoni aktar diretta (Andersen et al, 1998) hija magħmula permezz taż-żamma tal-ekwazjoni oriġinali u l-użu ta' espansjoni ta' Taylor madwar il-medji ta' r_i u r_0

Reċentement metodi "boot strap" saru popolari. Tali metodi jużaw id-dejta mkejla u ġeneratur ta' numru kif ġie ġie li jiddirezjona rikampjunar ta' spiss, sabiex jistmaw varjazzjoni tad-distribuzzjoni empirika.

Letteratura

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): Konċentrazzjonijiet bla effett f'testijiet ta' inibizzjoni ta' tkabbir ta' alka. Riċerka tal-ilma, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D. u Versteeg, D.J.(1992) Proċedura Statistika għall-Immudellar Kontinwu ta' Dejta Ekotossikoloġika. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Dejta ekotossikoloġika kontinwa valutata relattivament ma' rispons ta' kontroll. Ġurnal ta' Statistiċi, Agrikoli, Bijoloġiċi u Ambjentali, 3, 405-420.

▼B

C.4. **DETERMINAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ "LESTA"**

PARTI I. **KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI**

I.1. INTRODUZZJONI

Sitt metodi tat-ġtestijiet huma deskritti li jippermettu l-għażla tal-kimiċi għal biodegradabbilità lesta f; medja akwea arobika:

(a) Karbonju Organiku Mdewweb (DOC) Bit-Tneħħija tal-Kulur (Metodu °C.4-A)

(b) Għażla Modifikata OECD – DOC Bit-Tneħħija tal-Kulur (Metodu °C.4-B)

(ċ) Evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju (CO_2) (Test Sturm modifikat (Metodu °C.4-C)

(d) Respirometrija Manjometrika (Metodu °C.4-D)

(e) Flixkun magħluq (Metodu °C.4-E)

(f) MITI (Ministeru tal-Kummerċ Internazzjonali u l-Industrija – Ġappun) (Metodu °C.4-F)

Konsiderazzjonijiet ġenerali u komuni għas-sitt testijiet kollha huma mogħtija fil-Parti I tal-metodu. Punti speċifiċi għal metodi individwali huma mogħtija fil-Partijiet II sa VII. L-annessi fihom definizzjonijiet, formuli u materjal ta' gwida.

Eżerċizzju ta' tqabbil inter-laboratorju OECD, magħmul fil-1988, kien wera li l-metodi jagħtu riżultati konsistenti. B'danakollu, jiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi tal-sustanza tat-test, wieħed jew ieħor mill-metodi jista jkun preferut.

I.2. SELEZZJONI TAL-METODU XIERAQ

Sabiex ikun magħżul il-metodu l-aktar xieraq, informazzjoni dwar is-solubbiltà tal-kimika, pressa tal-fwar u l-karatteristiċi ta' l-assorbazzjoni huma essenzali. L-istruttura jew il-formula tal-kimika għandhom ikunu magħrufa sabiex ikun ikkalkolati l-valuri teoretiċi u/jew il-verifika tal-valuri mkejla tal-parametri, eż. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (ara l-Annessi I u II).

Kimiki tat-test li jinħallu fl-ilma għal mill-anqas 100 mg/l jistgħu ikunu assessjati bil-metodi kollha, basta li dawn ma jkunux volatili u mhux-assorbanti. Għal dawk il-kimiki li jinħallu bilmod fl-ilma, li huma volatili jew assorbanti, metodi xierqa huma indikati fit-Tabella 1. Il-manjera li biha l-kimiċi li jinħallu bilmod fl-ilma u kimiki volatili jistgħu ikunu ittratti kif deskritt fl-Anness III. Kimiki moderatament volatili jistgħu ikunu ittestjati bil-metodu DOC tat-Tneħħija tal-Kulur jekk ikun hemm spazzju biż-żejjed tal-gass fir-reċipjenti tat-test (li għandhom ikunu magħluqa sewwa). F'dan il-każ, kontrol abjotiku jista jkun stabbilit sabiex jippermetti għal xi telf fiżiku.

▼B

Tabella 1

Applikabbiltà tal-metodi tat-test

Test	Metodu analitiku	Adattabbilità għal taħlitiet li huma:		
		Jinħallu ftit	volatili	assorbenti
DOC Tneħħija tal-kulur	Karbonju organiku mdewweb	—	—	+/–
Mod. OECD Tneħħija tal-kulur	Karbonju organiku mdewweb	—	—	+/–
Evoluzzjoni CO_2	Respirometrija: Evoluzzjoni CO_2	+	—	+
Respirometrija manometrika	Respirometrija manometrika: konsum ta' l-ossiġenu	+	+/–	+
Flixkun magħluq	Respirometrija: ossiġenu mdewweb	+/–	+	+
MITI	Respirometrija: konsum ta' l-ossiġenu	+	+/–	+

Informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet relattivi ta' komponenti maġġuri tal-materjal tat-test hija meħtieġa għall-interpretazzjoni tar-riżultati akkwistati, speċjalment meta r-riżultati huma baxxi jew marġinali.

Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika tat-test mal-bakterja (l-Anness IV) tista tkun ferm utili għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista tkun essenzjali għall-interpretazzjoni tajba tal-valuri tal-biodegradazzjoni baxxa.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sabiex tkun verifikata l-proċedura, kimiċi ta' referenza li jilħqu l-kriterja għal biodegradabbilità faċli huma ittestjati billi jkun hemm garafina xierqa b'mod parallel mal-provi nomali tat-test.

Kimiċi xierqa huma l-anilin (iddistillat frisk), l-aċetat tas-sodju u l-benżoat tas-sodju. Dawn il-kimiċi ta' referenza kollhom jkollhom degradazzjoni b'dawn il-metodi meta l-ebda inoculum ma jkun deliberatament miżjud.

Huwa suġġerit li kika ta' referenza għandha tkun imfittxija li jkollha biodegradabbilità faċli imma meħtieġa b'żieda ma l-inoculum. Il-ftalat ta' l-idroġenu tal-putassa kien proponut imma aktar evidenza jeħtieġ li tkun akkwistata b'din is-sustanza qabel ma tista tkun aċċettata bħal sustanza ta' referenza.

Fit-testijiet respirometriċi, il-komposti li jkun fihom in-nitroġenu jistgħu jaffettwaw l-akkwist ta' l-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni (ara l-Annessi II u V).

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI TAT-TEST

Taħlita, jew sospenzjoni, tas-sustanza tat-test f'medja minerali, hija innokulata u inkubata permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, fid-dlam jew f'dawl baxx hafna. L-ammont ta' DOC fit-taħlita tat-test minħabba l-inoculum għandu jinżamm baxx kemm jista jkun possibbli imqabbel ma l-ammont ta' DOC minħabba s-sustanza tat-test. Għandu jkun hemm marġini għall-attività endoġenea ta' l-inoculum billi jkunu mwettqa testijiet parallelli fl-imbjank bl-inoculum imma mingħajr is-sustanza tat-test, għalkemm l-attività endoġenea taċ-ċelloli fil-preżenta tas-sustanza ma tkunx eżattament taqbel ma dik fil-kontroll endoġeneu. Sustanza ta' referenza tkun utilizzata b'mod parallel għall-verifika ta' l-operazzjoni tal-proċeduri.

▼B

Ġeneralment, degradazzjoni hija segwita bid-determinazzjoni tal-parametri, bħalma huma DOC, produzzjoni CO_2 bl-akkwist ta' l-ossiġenu, u l-kejl ikun meħud f'intervalli ta' spiss suffiċjenti sabiex jippermettu l-identifikazzjoni tal-bidu u tat-tmiem tal-biodegradazzjoni. B'respirometri awtomatiċi, il-kejl ikun kontinwu. DOC ta' kultant huwa mkejjel b'żieda ma parametru ieħor, imma dan normalment iseħħ biss fil-bidu u fit-tmiem tat-test. Analiżi kimika speċifika tista wkoll tkun użata għall-assessjar tad-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test, u sabiex tkun determinata l-konċentrazzjoni ta' xi sustanzi intermedji iffurmati (obligatorja fit-test MITI).

Normalment, it-test idum 28 jum. B'danakollu, t-testijiet jistgħu jieqfu qabel it-28 jum, i.e. malli l-kurva tal-bijodegredazzjoni tkun laħqet il-quċċata lixxa għal mill-anqas 3 determinazzjonijiet. It-testijiet jistgħu wkoll ikunu mtawla lill hinn minn 28 jum meta l-kurva turi li l-biodegradazzjoni tkun bdiet imma l-quċċata lixxa ma tkunx intlaħqet fil-jum 28.

I.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

1.5.1. **Reproduċibbiltà**

Minħabba n-natura tal-biodegradazzjoni u tal-popolazzjoni mħallta tal-bakterja użata bħala inocula, determinazzjonijiet għandhom jitwettqu mill-anqas b'mod doppju.

Hija esperjenza komuni li akbar ma tkun il-konċentrazzjoni tal-mikro-organiżmi inizjalment miżjuda mal-medja tat-test, aktar tkun żgħira l-varjazzjoni bejn ir-repetizzjonijiet. Testijiet biċ-ċrieki kienu wkoll urew li kien hemm varjazzjonijiet kbar bejn ir-riżultati akkwistati minn laboratorji differenti, imma ftehim tajjeb huwa normalment akkwistat b'komposti faċilment biodegradabbli.

1.5.2. **Validità tat-test**

Test huwa meqjus bħala validu jekk id-differenza ta' l-estremi fil-valuri tar-repetizzjoni tat-tneħħija tal-kimika tat-test fil-quċċata lixxa, fit-tmiem tat-test jew fit-tmiem tas-sessjoni ta' 10 ijiem, kif xieraq, hija anqas minn 20 % u jekk il-perċentwal tad-degradazzjoni tas-sustanza ta' referenza jkun laħaq il-livell għal biodegradabbiltà faċli sa 14-il jum. Jekk waħda minn dawk il-kondizzjonijiet ma tkunx milħuqha, it-test għandu jkun repetut. Minħabba l-limitazzjoni stretta tal-metodi, valuri baxxi mhux neċessarjament ifissru li s-sustanza tat-test ma tkun biodegradabbli permezz tal-kondizzjonijiet ambjentali, imma tindika li aktar xogħol għandu jsir sabiex tkun stabbilita l-biodegradabbiltà.

Fit-test tat-tossiċità, li jkun fih kemm it-test tas-sustanza u kimika ta' referenza, anqas minn 35 % degradazzjoni (ibbażat fuq DOC) jew anqas minn 25 % (ibbażata fuq ThOD jew $ThCO_2$) li tkun seħħet matul l-14-il jum, il-kimika tat-test tista tkun meqjusa bħala inibitriċi (ara wkoll l-Anness IV). Is-serje ta' testijiet għandu jkun repetut, jekk possibbli bl-użu ta' konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test u/jew ta' konċentrazzjoni aktar għolja ta' l-inoculum, imma mhux aktar minn 30 mg solidi/litru.

I.6. PROCEDURA ĠENERALI UPREPARAZZJONIJIET

Il-kondizzjonijiet ġenerali applikabbli għat-testijiet huma riassunti fit-Tabella 2. Apparat u l-kondizzjonijiet sperimentali tal-kondizzjonijiet li jappartieni speċifikament għal test individwali huma deskritti aktar tard taħi l-intestatura għall-dak it-test.

▼B

Tabella 2

Kundizzjonijiet tat-test

Test	DOC Tneħħija tal-kulur	Evoluzzjoni CO_2	Respirometrija manometrika	Għażla modifikati	Flixkun magħluq OECD	MITI (1)
Konċentrazzjoni tas-Sustanza tat-test hija bħ						
ala mg/l			100		2-10	100
mg DOC/l	10-40	10-20	10-40			
mg ThOD/l			50-100		5-10	
Konċentrazzjoni ta' l-Inoculum (f'ċelloli/I, b'mod approssimattiv)	≤ 30 mg/1 SS jew ≤ 100 ml effluwent/1 (10^7- 10^8)			0,5 ml affluwent sekondarju/l (10^5)	≤ 5 ml ta' l-effluwent/1 (10^4 - 10^6)	30 mg/l SS (10^7 - 10^8)
Konċentrazzjoni ta' l-elementi filmedja minerali (fi mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					preferibbilment 7,0
Temperatura	22 ± 2 °C					25 + 1 °C

DOC = Dissolved Organic Carbon (Karbonju organiku mdewweb)

ThOD = Theoretical Oxygen Demand (Talba teoretika ta' l-ossiġenu)

SS = Solidi sospiżi

I.6.1. **Ilma tat-trattib**

Ilma deonizzat jew distillat, ħieles minn konċentrazzjonijiet inibitorji ta' sustanzi tossiċi (eż. Cu^{++} jonji) huwa wżat. Dan għandu jkun fih mhux aktar minn 10 % tal-kontenut tal-karbonju organiku introdott bil-materjal tat-test. Il-purità għolja ta' l-ilma tat-test hija meħtiega sabiex telimina l-valuri għolja fl-imbjank. Kontaminazzjoni tista tirriżulta minn impuritajiet inerenti u wkoll minn reżini ta' l-iskambju tal-jonji u l-materjal lysed mill-bakterja u l-algae. Għal kull serje ta' testijiet għandek tuża lott wieħed biss ta' ilma, ivverifikat bil-quddiem bl-analiżi DOC. Tali verifika ma tkunx meħtieġa għat-test tal-flixkun magħluq, imma l-konsum ta' l-ossiġenu ta' l-ilma għandu jkun baxx.

▼B

I.6.2. **Taħlitiet bil-lest ta' komposti minerali**

Sabiex isiru t-taħlitiet tat-test, taħlitiet bil-lest tal-konċentrazzjonijiet xierqa jkunu magħmula minn komponenti minerali. Dawn it-taħlitiet bil-lest li ġejjin jistgħu jkunu wżati (bil-fatturi differenti tat-trattib) għall-metodu DOC Tneħħija bil-kulur, Għażla OECD Modifikata, Evoluzzjoni CO_2, Respirometrija Manometrika, it-test tal-Flixkun Magħluq.

Il-fatturi tat-trattib u, għat-test MITI, il-preparazzjoni speċifika tal-medja minerali, huma mogħtija taht l-intestaturi tat-testijiet speċifiċi.

Taħlitiet bil-lest:

Ipprepara t-taħlitiet bil-lest li ġejjin, bl-użu ta' reaġenti ta' grad analitiku.

a	Monopotassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4	8,50 g
	Dipotassium monohydrogen orthophosphate, K_2HPO_4 Disodium	21,75 g
	monohydrogen orthophosphate dihydrate Na_2HPO_4. 2 H_2O Klorid	33,40 g
	ta' l-ammonium NH_4Cl	0,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal sa 1 litru. Il-pH tat-taħlita għandu jkun 7,4.	
b	Klorid tal-kalċji, anidriju, $CaCl_2$	27,50 g
	jew dihidrat tal-klorid tal-kalċju $CaCl_2$, 2 H_2O	36,40 g
	Dewweb fl-ilma u wassal sa litru	
c	Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $MgSO_4$. 7 H_2O	22,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru	
d	Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, $FeC1_3$. $6H_2O$	0,25 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	

Nota: Sabiex tkun evitata l-ħtieġa li tkun ippreparata din is-soluzzjonu immedjetament qabel l-użu, żid qatra ta' HCL ikkonċentrat, jew 0,4 g melħ disodju ta' l-aċidu ethylenediaminetetra-aċetiku (EDTA) kull litru.

1.6.3. **Taħlitiet bil-lest ta' kimiċi**

Per eżempju, dewweb 1-10 g, kif xieraq, tal-kimika tat-test jew ta' referenza, f'ilma de-jonizzata u wassal sa litru meta s-solubbiltà teċċedi 1 g/l. Altrimenti, ipprepara t-taħlitiet bil-lest fil-medja minerali jew żid il-kimika direttament mal-medja minerali. Għat-trattament ta' kimiċi anqas solubbli, ara l-Anness III, imma fit-test MITI (il-Metodu °C.4-F), la s-solventi u l-anqas l-aġenti emulsifikanti m'għandhom ikunu wżati.

▼B

1.6.4. **Inocula**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: ħama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u ħamrija jew minn taħlita ta' dawn. Għal testijiet tar-Repirometrija ta' l-Evoluzzjoni jew Manjometika DOC Tneħħija bil-Kulur, CO_2, jekk il-ħama' attivata tkun użata, dan għandu jkun meħud minn impjant tat-trattament jew unità ta' skala ta' laboratorju li tirċieci predominantament drenaġġ domestiku. Kien instab li Inocula minn sorsi oħrajn tagħti tixrid aktar għoli tar-riżultati. Għall-għażla OECD Modifikata u t-testijiet tal-Flixkun Magħluq, inoculum mingħajr il-frak tal-ħama' aktar imdewwb huwa meħtieġ u s-sorsi preferita huwa l-effluwent sekondarju mill-impjant tat-trattament ta' l-ilma ta' l-iskart domestiku jew minn unita ta' skala ta' laboratorju. Għat-test MITI, l-inoculum huwa akkwistat minn taħlita ta' sorsi u huwa deskritt taħt l-intestatura ta' dan it-test speċifiku.

I.6.4.1. *Inoculum minn ħama' attivita*

Iġbor kampjun minn ħama' attivata friska mit-tank ta' l-arjazzjoni ta' l-impjant tat-trattament tad-drenaġġ jew minn unit'ta' skala tal-laboratorju li predominantament jitratta d-drenaġġ domestiku. Warral il-partiċelli rozzi, jekk meħtieġ bil-filtrazzjoni minn passatur fin u wara dan zomm il-ħama f'mod erobiku.

B'mod alternattiv, ħalli joqgħod, jew inkella għaddi miċ-ċentrufuga (eż. fi l 100 g għal 10 min.) wara t-tneħħija ta' xi partiċelli rozzi. Warrab is-supernatant. Il-ħama tista tkun maħsula f'medja minerali. Issospendi l-ħama ikkonċentrata f'medja minerali sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' 3-5 g solidi sospiżi kull litru u imla bl-arja sakemm meħtieġ.

Il-ħama' għandha tkun miġbura proporzjonalment minn impjant ta' xogħol konvenzjonali. Jekk il-ħama jkun jeħtieġ li tinġabar minn impjant ta' trattament qawwi, jew ikun maħsub li jkun fiha inibituri, din għandha tkun maħsula. Ħalliha toqgħod jew għaddi l-ħama' sospiża mill-ġdid minn ċentrifugu wara li tkun imħallta sewwa, warrab is-supernatant u mill-ġdid erġa issospendi l-ħama' maħsula f'volum ieħor tal-medja minerali. Irrepeti din il-proċedura sakemm il-ħama' tkun meqjusa bħala ħielsa minn substrata jew inibitur eċċessivi.

Wara li s-sopenzjoni sħiħa mill-ġdid tkun akkwistata, jew b'ħama' mhux trattata, warrab il-pamkun immedjetament qabel l-użu għad-determinazzjoni tal-piż xott tas-solidi sospiżi.

Alternattiva oħra hija li tkun omoġenizzata l-ħama' attivata (3-5 g solidi sospiżi kull litru). Il-ħama' hija trattata f'ħawwadi mekkaniku għal 2 minuti f'veloċità medja. Ħalli l-ħama' tal-ħawwadi toqgħod għal 30 minuta jew aktar jekk hekk meħtieġ u ferra l-likwidu għall-użu bħala inoculum bir-rata ta' 10 ml/l tal-medja minerali.

I.6.4.2. *Sorsi oħrajn ta' l-inoculum*

Dan jista jkun akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Iġbor kampjun frisk u żommu erobiku waqt it-trasport. Ħallieh joqgħod għal siegħa jew iffiltra minn karta rozza tal-filtru u żomm l-effluwent imferra jew il-filtrat erobiku sakemm ikunu meħtieġa. Sa 100 ml ta' dan it-tip ta' inoculum jista jkun użat ma kull litru ta' medja.

▼B

Sors ieħor għall-inoculum hija l-ilma tal-wiċċ ta' l-art. F'dan il-każ, iġbor kampjun xieraq mill-ilma tal-wiċċ, eż. xmara, għadira, u żommu erobiku sakemm ikun meħtieġ. Jekk meħtieġ, ikkonċentra l-inoculum bil-filtrazzjoni jew biċ-ċentrifugazzjoni.

1.6.5. **Pre-kondizzjonat ta' l-inocula**

L-inocula tista tkun pre-kondizzjonata għall-kondizzjonijiet sperimentali,, imma mhux pre-afattata għall-kimika tat-test. Il-pre-kondizzonjar jikkonsisti mill-arjazzjoni tal-ħama' attvita f'medja minerali jew effluwent sekondarju għal 5-7 tijiem fit-temperatura tat-test. Il-pre-kondizzjonar ta' kull tant itejjeb il-prċiżjoni tal-metodi tat-test bit-tnaqqis tal-valuri vojta. Huma meqjus bħala mhux neċessarju il-pre-kondizzjonar ta' l-inoculum MITI.

1.6.6. **Kontrolli abjotiċi**

Meta meħtieġ, għandek tivverifika d-degradazzjoni abjotika possibbli tas-sustanza tat-test bid-determinazzjoni tat-tneħħija ta' DOC, l-akkwist ta' l-ossiġenu jew ta' l-evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju f'kontrolli sterili li ma jkun fihom l-ebda inoculum. Sterlizza bil-filtrazzjoni minn membrana (0,2 - 0,45 mikrometri) jew biż-żieda ta' sustanza tossika xierqa fil-konċentrazzjoni adatta. Jekk tkun użata l-membrana tal-filtrazzjoni, iġbor kampjuni b'mod axettiku għaż-żamma tal-isterilità. Sakemm l-assorbazzjoni tal-kimika tat-test ma tkunx diġa ġiet imwarrba minn qabel, testijiet li jkejlu l-biodegradazzjoni bħala t-tneħħija ta' DOC, speċjalment bl-inocula tal-ħama' attivita, għandhom jinkludu kontroll abjotiku li huwa innokulat u ivvelenat.

I.6.7. **Numru ta' garafini**

In-numru ta' garafini fi prova tipika huwa deskritt taħt l-intestaturi ta' kull wieħed mit-testijiet.

It-tip ta' garafina li ġej jista jkun użat:

— Sospenzjoni tat-test: li jkun fiha s-sustanza tat-test u l-inoculum

— Inoculumi fl-imbjank: li jkun fih biss l-inoculum

— Proċedura tal-kontroll: li jkun fiha s-sustanza ta' referenza u l-inoculum

— Kontroll ta' abjotiku sterili: sterili, li jkun fiha s-sustana tat-test (ara I.6.6)

— Kontroll ta' l-adsorbazzjoni: li jkun fiha s-sustanza, l-inoculum u l-aġent sterilizzanti

— Kontroll tat-tossiċità: li jkun fiha s-sustanza tat-test, is-sustanza ta' referenza u l-inoculum

Huwa mandatorju li d-determinazzjoni tas-sospenzjoni tat-test u l-imbjank ta' l-inoculum iseħħ b'mod paralell. Huwa rakommandabbli li jsiru d-determinazzjonijiet fil-garafini l-oħrajn b'mod parallel ukoll.

Dan jista, b'danakollu, mhux dejjem ikun possibbli. Assigura li kampjoni jew qari suffiċjenti jkunu meħuda sabiex jippermettu t-tneħħija perċentwali fl-ispażju ta' l-10 ijiem ta' l-assessjar.

▼B

I.7. DATA U EVALWAZZJONI

Fil-kalkolu ta' D_t, id-degradazzjoni preċentwali, il-valuri medji tal-kejl duplikat tal-parametru fiż-żewġ reċipjenti tat-test u l-imbjank ta' l-inoculum, ikunu wżati. Dawn il-formuli huma stabbiliti fis-sezzjonijiet ta' hawn taħt fit-testijiet speċifiċi. Il-korsa tad-degradazzjoni hija murija b'mod grafiku u l-perijodu ta' 10 ijiem huwa indikat. Ikkalkola u irrapporta l-perċentwal tat-tneħħija milħuq fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-valur tal-quċċata lixxa jew fit-tmiem tat-test, liema minnhom huwa xieraq.

Fit-testijiet respirometriċi, l-komposti li jkun fihom in-nitroġenu jistgħu jaffettwaw l-akkwist ta' l-ossiġenu minħabba n-nitrifikazzjoni (ara l-Annessi II u V).

I.7.1. **Degradazzjoni mkjela permezz tad-determinazzjoni DOC**

Id-degredazzjoni perċentwali D_t kull darba li kampjun ikun miġbur għandha tkun ikkalkolata b'mod separat għal kull waħda mill-garafini li jkun fihom is-sustanza tat-test bl-użu tal-valuri medji tal-kejn duplikat DOC sabiex il-validità tat-test tista tkun assessjata (ara I.5.2.). Hija ikkalkolata bl-użu ta' din l-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

meta:

D_t = % degradazzjoni fil-ħin t,

C_o = il-medja tal-bidu tal-konċentrazzjoni ta' DOC tal-kultura inokulata fil-medju li jkun fih is-sustanza tat-test (mg DOC/l),

C_t = il-medja tal-konċentrazzjoni ta' DOC tal-kultura innokulata fil-medju li jkun fih is-sustanza fil-ħin t (mg DOC/l),

C_{bo} = il-medja tal-bidu tal-konċentrazzjonini ta' DOC fl-imbjank inokulata fil-medja minerali (mg DOC/l),

C_{bt} = il-medja tal-konċentrazzjoni ta' DOC fl-imbjank innokulata fil-medja minerali fil-ħin t (mg DOC/l),

Il-konċentrazzjoninijiet kollha huma mkejla b'mod sperimentali.

I.7.2. **Degradazzjoni mkjela permezz ta' analiżi speċifika**

Meta data analitika speċifika tkun disponibbli, wettaq il-kalkolazzjoni tal-biodegredazzjoni primarja minn:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

meta:

D_t = % degradazzjoni fil-ħin t, normalment 28 jum,

S_a = ammont residwu tas-sustanza tat-test fil-medja inokulata fit-tmiem tat-test (mg),

S_b = l-ammont residwu tas-sustanza tat-test fit-test fl-imbjank bl-ima/medja li magħha tkun ġiet miżjuda biss is-sustanza tat-test (mg).

▼B

I.7.3. **Degredazzjoni abjotika**

Meta jkun użat il-kontroll abjotiku sterili, wettaq il-kalkolazzjoni tal-perċentali tad-degradazzjoni abjotika bl-użu:% degradazzjoni abjotika

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

Meta:

$C_{s(o)}$ = DOC Il-konċentrazzjonini sterili tal-kontroll fil-jum 0

$C_{s(t)}$ = DOC Il-konċentrazzjonini sterili tal-kontroll fil-jum t

I.8. RAPPURTAĠĠ

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— is-sustanzi tat-test u tar-referenza, u il-purità tagħhom,

— il-kondizzjoni tat-test,

— inoculum: is-sit(i) tan-natura u l-kampjunar, konċentrazzjonini u xi trattament ta' pre-kondizzjonar;

— il-proporzjon u n-natura tal-iskart industriali preżenti fid-drenaġġ, jekk magħruf;

— iż-żmien u t-temperatura tat-test;

— fil-każ ta' kimika tat-test li ma tantx tinħall, it-trattament mogħti;

— il-metodu tat-test applikat; ir-raġinijiet xjentifiċi u l-ispejagazzjoni għandha tkun mogħtija għal xi tibdil tal-proċedura;

— il-folja tad-data;

— kwalunkwe fenomena ta' l-inibizzjoni;

— xi degradazzjoni abjotika osservata;

— id-data speċifika kimika analitika, jekk disponibbli;

— id-data analitika dwar l-intermedjati, jekk disponibbli;

— il-grafika tad-degradazzjoni perċentwali kontra l-ħin għat-test u s-sustanzi ta' referenza; il-fażi li ddewwem il-process, il-fażi tad-degradazzjoni, il- perijodu ta' 10 ijiem u l-linja għandha kjarament tkun indikata (l-Anness I). Jekk it-test ikun konformi mal-kriterja tal-validità, l-medja tal- perċentwali tad-degradazzjoni fil-garafini li jkun fihom is-sustanza tat-test tista tkun użata għall-grafika.

— perċentwal tat-tneħħija eata l-perijodu ta' 10 ijiem, u l-linja lixxa fil-quċċata jew fit-tmiem tat-test.

PARTI II. **DOC TEST TAT-TNEĦĦIJA TAL-KULUR** (Metodu C.4-A)

II.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata li jkun fiha konċentrazzjonini magħrufa tas-sustanza tat-test 10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju organiku jkun mogħti l-arja fid-dlam jew fid-dawl baxx fi 22 ± 2 °C.

▼B

Id-degradazzjoni hija segwita bl-analiżi DOC matul intervalli frekwenti matul perijodu ta' 28 jum. Il-grad tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat bl-espressjoni tal-konċentrazzjoni DOC imneħħija (ikkorreġuta għal dak fil-kontroll ta' l-inoculum fl-imbjank) bħala perċentwali tal-konċentrazzjoni inizjali preżenti. Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni.

II.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

11.2.1. **Apparat**

(a) Garafini koniċi, eż. 250 ml sa 2 l, jiddependi mill-volum meħtieġ għall- analiżi DOC;

(b) Magna taċ-ċekċik li tista takkomoda l-garafini koniċi, jew bil-kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata fit-temperatura kostanti tal-kamra, u forza suffiċjenti tal-potenza għaż-żamma tal-kondizzjonijiet etobiċi fil-garafini kollha;

(ċ) Apparat tal-filtrazzjoni, b'membrani xierqa;

(d) Analiżattur DOC;

(e) Apparat għad-determinazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb;

(f) Ċentrifuga.

11.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 10 ml tat-taħlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-taħlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

11.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: ħama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u ħamrija jew minn taħlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

11.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Bħala eżempju, introduċi 800 ml porzjonijiet tal-medja minerali ġewwa garafini koniċi 2 l u żid volumi suffiċjenti tat-taħlitiet bil-lest tat-test u tas-sustanzi ta' referenza mal-garafini separati sabiex takkwista konċentrazzjoni kemikali ekwivalenti għal 10-40 mg DOC/l. Ivverifika l-valuri pH u aġġusta, jekk meħtieġ, għal 7,4. Inokula l-garafini b'ħama' attivita jew b'sorsi oħrajn ta' l-inocula (ara I.6.4.), sabiex takkwista konċentrazzjoni mhux aktar minn 30 mg solidi sospiżi fil-litru. Ipprepara wkoll il-kontrolli ta' l-inoculum fil-medja minerali imma mingħajr il-kimika tat-test jew ta' referenza.

Jekk meħtieġ, uża reċipjent wieħed sabiex tivverifika l-possibbiltà ta' l-effett inibitorju tal-kimika tat-test bl-inokulazzjoni tat-taħlita li jkun fiha, fil-medja minerali, konċentrazzjonijiet komparabbli kemm tal-kimika tat-test u dik ta' referenza.

Ukoll, jekk meħtieġ, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradata abjotikament bl-użu tat-taħlita mhux inokulata tal-kimika (ara I.6,6.).

▼B

B'mod addizzjonali, jekk ikun hemm suspett li l-kimika tat-test tkun sinifikament assorbita fuq il-ħġieġ, ħama' eċċ., wettaq assessjar preliminari sabiex tkun determinata l-medda possibbli ta' l-assorbazzjoni u b'hekk l-adattabbiltà tat-test għall-kimika (ara t-Tabella 1). Organizza garafina li jkun fiha s-sustanza tat-test, l-inculum u l-aġent sterilizzanti.

Wassal il-volumi fil-garafini kollha għal 1:1 bil-medja minerali u, wara t-taħwib, ħu kampjun minn kull garafina sabiex tiddetermina l-konċentrazzjonini inizjali ta' DOC (ara l-Anness II,4). Għatti l-ftugħ tal-garafini, eż. b'liega ta' l-aluminju, b'tali mod hekk li tippermetti l-iskambju ħieles ta' l-arja bejn il-garafina u l-atmosfera tal-madwar. Imbagħad deffes ir-reċipjenti fil-magna taċ-ċekċik għall-bidu tat-test.

11.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test,

Il-garafini 3 u 4: L-imbjank ta' l-inoculum,

Il-garafina 5: Proċedura tal-kontroll preferibbilment

u meta meħtieġ:

Il-garafina 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Il-garafina 7: Kontroll ta' l-adsorbazzjoni

Il-garafina 8: Kontroll tat-tossiċità

Ara wkoll I.6.7.

II.2.6. **It-twettieq tat-test**

Matul it-test, iddetermina l-konċentrazzjonijiet ta' DOC f'kull garafina b'mod doppju f'intervalli tal-ħin magħruf, ta' spiss b'mod suffiċjenti sabiex tkun tista tiddetermina l-bidu tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-persentaġġ tat-tneħħija fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem. Ħu biss il-volum minimu tas-sospenzjoni tat-test meħtieġ għal kull determinazzjoni.

Qabel il-kampjunar għamel tajjeb għat-telf ta' l-evaporazzjoni mill-garafini biż-żieda ta' ilma tat-trattib (I.6.1) fl-ammont meħtieġ, jekk ikun neċessarju. Ħawwad il-medja tal-kultura sewwa qabel ma tiġbed il-kampjun u assigura li l-materjal li jeħel mal-ġnub tar-reċipjenti jkun imdewweb jew sospiż qabel il-kampjunar. Immedjetament iffiltra mill-membrana jew b'ċentrifuga (ara l-Anness II.4) wara li jkun inġabar il-kampjun. Analizza l-kampjuni tal-filtrat jew taċ-ċentrifuga l-istess jum, altrimentri aħżen fi 2-4 °C għal massimu ta' 48 siegħa, jew f'anqas minn 18 °C għal perijodu twil.

II.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

II.3.1. **Trattament tar-riżultati**

Ikkalkola l-persentaġġ tad-degradazzjoni fil ħin kif mogħti taħt I.7.1. (determinazzjoni DOC) u, preferibbilment, taħt I.7.2. (analiżi speċifika).

Irreġistra r-riżultati kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

▼B

11.3.2. **Validità tar-riżultati**

Ara I.5.2.

11.3.3. **Rappurtaġġ**

Ara I.8.

II.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST DOK TAT-TNEĦĦIJA TAL-KULU R

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/l bħala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, għal: mg/l bħala kimika

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/l

5. **DETERMINAZZJONI TAL-KARBONJU**

Analizzatur tal-karbonju:

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Kimika tat-test flimkien ma l-inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, medja $C_{a(t)}$					
	2	b^1					
		b^2					
		b, medja $C_{b(t)}$					

▼B

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Inoculum fl-imbjank mingħajr il-kimika tat-test	3	c_1					
		c_2					
		c, medja $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medja $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALWAZZJONI TAD-DATA MHIX ITTRATTATA**

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Medja (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D1 u D_2 m'għandhiex tittieħed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **KONTROLLI ABJOTICI** (voluntarji)

	Żmien (jiem)	
	0	t
Konċ. DOC (mg/l) f'kontroll sterili	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALŻI TA' KIMIKA SPECIFIKA** (voluntarja)

	ammont residwu tal- kimika tat-test fit-tmiem (mg/l)	% degradazzjoni primarja tat-test
Kontroll sterili	S_b	

▼B

	ammont residwu tal- kimika tat-test fit-tmiem (mg/l)	% degradazzjoni primarja tat-test
Medja tat-test inokulat	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTI III. **TEST TA' L-GĦAŻLA OECD MODIFIKATA** (Metodu °C.4-B)

III.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata li jkun fiha konċentrazzjoni magħrufa tas-sustanza tat-test (10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju huwa inokulat b' 0,5 ml effluwent kull litru tal-medja. It-taħlita hija mogħtija l-arja fid-dlam jew f'dawl baxx ħafna fi 22 ± 2 °C.

Id-degradazzjoni hija segwita bl-analiżi DOC matul intervalli frekwenti matul perijodu ta' 28 jum. Il-grad tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat bl-espressjoni tal-konċentrazzjonini DOC imneħħija (ikkorreġuta għal dak fil-kontroll ta' l-inoculum fl-imbjank) bħala perċentwali tal-konċentrazzjonini inizjali preżenti. Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni.

III.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

III.2.1. Apparat

a) Garafini koniċi, eż. 250 ml sa 2 1itri, jiddependi mill-volum meħtieġ għall-analiżi DOC;

b) Magna taċ-ċekċik – li tista takkomoda l-garafini koniċi, jew bil-kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata fit-temperatura kostanti tal-kamra, u forza suffiċjenti tal-potenza għaż-żamma tal-kondizzjonijiet etobiċi fil- garafini kollha;

ċ) Apparat tal-filtrazzjoni, b'membrani xierqa;

d) Analiżattur DOC;

e) Apparat għad-determinazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb;

f) Ċentrifuga.

III.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 10 ml tat-taħlita (a) ma 80 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-taħlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

Dan il-metodu jiża biss 0,5 ml effluwent/litru bħala inoculum u għalhekk il-medja jista jkun li tkun teħtieġ li tkun imsaħħa b'elementi traċċa u fatturi tat-tkabbir. Dan huwa magħmul biż-żieda ta' 1 ml kull wieħed mat-taħlitiet li ġejjin għal kull litru tal-medja finali:

▼B

Taħlita ta' l-element traċċa:

Tetraidrat tas-sulfat tal-magnežja, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Aċidu Boriku, H_3BO_3	57,2 mg
Ħepaidrat tas-sulfat taż-żingu, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Ammonium heptamolybdate $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-ċelat ($FeCl_3$ aċidu ethylenediamine-tetra-aċetiku)	100,0 mg
Dewweb fi, u wassal għal 1 000 ml bl-ilma tat-trattib	
Taħlita tal-vitamina:	
Estratt tal-ħmira	15,0 mg

Dewweb l-estratt tal-ħmira fi 100 ml ilma. Sterlizza bil-passaġġ minn membrana 0,2 mikronji, jew għamilha friska.

III.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jkun akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Ara I.6.4.2. u I.6.5.

0,5 ml kull litru tal-medja minerali hija użata.

III.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Bħala eżempju, introduċi 800 ml porzjonijiet tal-medja minerali ġewwa garafini koniċi 2 l u żid volumi suffiċjenti tat-taħlitiet bil-lest tat-test u tas-sustanzi ta' referenza mal-garafini separati sabiex takkwista konċentrazzjoni kemikali ekwivalenti għal 10-40 mg DOC/1. Ivverifika l-valur pH u aġġusta, jekk meħtieġ, għal 7,4. Innokula l-garafini fl-effluwent tad-drenaġġ fi 0,5 ml/litru (ara I.6.4.2.). Ippreparata wkoll il-kontrolli ta' l-inoculum fil-medja minerali mingħajr il-kimika tat-test jew ta' referenza.

Jekk meħtieġ, uża reċipjent wieħed sabiex tivverifika l-possibbiltà ta' l-effett inibitorju tal-kimika tat-test bl-inokulazzjoni tat-taħlita li jkun fiha, fil-medja minerali, konċentrazzjonijiet komparabbli kemm tal-kimika tat-test u dik ta' referenza.

Ukoll, jekk meħtieġ, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradat abjotikament bl-użu tat-taħlita mhix inokulata tal-kimika (ara I.6,6.).

B'mod addizzjonali, jekk ikun hemm suspett li l-kimika tat-test tkun sinifikament adsorbita fuq il-ħġieġ, ħama' eċċ., wettaq assessjar preliminari sabiex tkun determinata l-medda possibbli ta' l-adsorbazzjoni u b'hekk l-adattabbiltà tat-test għall-kimika (ara t- Tabella 1). Organizza garafina li jkun fiha s-sustanza tat-test, l-inculum u l-aġent sterilizzanti.

Wassal il-volumi fil-garafini kollha għal 1:1 bil-medja minerali u, wara t-taħwib, ħu kampjun minn kull garafina sabiex tiddetermina l-konċentrazzjonini inizjali ta' DOC (ara l-Anness II,4). Għatti l-ftugħ tal-garafini, eż. b'liega ta' l-aluminju, b'tali mod hekk li tippermetti l-iskambju ħieles ta' l-arja bejn il-garafina u l-atmosfera tal-madwar. Imbagħad deffes ir-reċipjenti fil-magna taċ-ċekċik għall-bidu tat-test.

▼B

III.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garafini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Il-garafini 5: Proċedura tal-kontroll

Preferibbilment u meta meħtieġ:

Il-garafini 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Il-garafini 7: Kontroll ta' l-adsorbazzjoni

Il-garafini 8: Kontroll tat-tossiċità

Ara wkoll I.6.7.

III.2.6. **It-twettieq tat-test**

Matul it-test, iddetermina l-konċentrazzjoninijiet ta' DOC f'kull garafina b'mod doppju f'intervalli tal-ħin magħruf, ta' spiss b'mod suffiċjenti sabiex tkun tista tiddetermina l-bidu tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-ersentaġġ tat-tneħħija fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem. Ħu biss il-volum minimu tas-sospenzjoni tat-test meħtieġ għal kull determinazzjoni.

Qabel il-kampjunar għamel tajjeb għat-telf ta' l-evaporazzjoni mill-garafini biż-żieda ta' ilma tat-trattib (I.6.1) fl-ammont meħtieġ, jekk ikun neċċessarju. Ħawwad il-medja tal-kultura sewwa qabel ma tiġbed il-kampjun u assigura li l-materjal li jeħel mal-ġnub tar-reċipjenti jkun imdewweb jew sospiż qabel il-kampjunar. Immedjatament iffiltra mill-membrana jew b'ċentrifuga (ara l-Anness II.4) wara li jkun inġabar il-kampjun. Analizza l-kampjuni tal-filtrat jew taċ-ċentrifuga l-istess jum, altrimentri aħżen fi 2-4 °C għal massimu ta' 48 siegħa, jew f'anqas minn 18 °C għal perijodu twil.

III.3. DATA URAPPORTAĠĠ

III.3.1. **Trattament tar-riżultati**

Ikkalkola l-persentaġġ tad-degradazzjoni fil ħin ta' kif mogħti taħt I.7.1. (determinazzjoni DOC) u, voluntarjament, taħt I.7.2. (analiżi speċifika).

Irreġistra r-riżultati kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

III.3.2. Validità tar-riżultati

Ara I.5.2.

III.3.3. Rappurtaġġ

Ara I.8.

III.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST MODIFIKAT TAL-GĦAŻLA OECD

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

▼B

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru bħala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, għal: mg/litru bħala kimika

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/l

5. **DETERMINAZZJONI TAL-KARBONJU**

Analizzatur tal-karbonju:

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/I)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Kimika tat-test flimkien ma l-inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, medja $C_{a(t)}$					
	2	b^1					
		b^2					
		b, medja $C_{b(t)}$					
Inoculum fl-imbjank mingħajr il-kimika tat-test	3	c_1					
		c_2					
		c, medja $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medja $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALWAZZJONI TAD-DATAMHIX ITTRATTATA**

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Medja (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 u D_2 m'għandhiex tittieħed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **KONTROLLI ABJOTICI** (voluntarji)

	Żmien (jiem)	
	0	t
Konċ. DOC (mg/l) f'kontroll sterili	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALŻI TA' KIMIKA SPECIFIKA** (voluntarja)

	Ammont residwu tal-kimika tat-test fit-tmiem	% degradazzjoni primarja tat-test
Kontroll sterili	S_b	
Medja tat-test inokulat	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTI IV. TEST TA' L-EVOLUZZJONU CO_2 (METODU °C.4-C)

IV.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali innokulata li jkun fiha konċentrazzjoni magħrufa tas-sustanza tat-test 10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju organiku jkun mogħti l-arja fid-dlam jew fid-dawl baxx. Id-degradazzjoni hija segwita matul 28 jiem bid-determinazzjoni tad-diossidu tal-karbonju prodott, li huwa marbut fil-barju jew fl-idossidu tas-sodju u li huma mkejjel bit-titrazzjoni ta' l-idrossu residwu bħala karbonju mhux organiku. L-ammont tad-diossidu tal-karbonju prodott mit-test kimiku (ikkorreġut għal dak derivat mill-inoculum fl-imbjank (huwa espress bħala persentaġġ ta $ThCO_2$. Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni.

▼B

IV.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

IV.2.1. **Apparat**

a) Garafini, 2-5 litri, kull waħda mgħammra b'tubu ta' l-arjazzjoni li jwassal sa kważi il-qiegħ tar-reċipjent u bi ħruġ;

b) Ħawwada manjetiċi, għal meta jsir l-assessjar tal-kimika li ma tantx tinħall;

ċ) Flixkien ta' assorbazzjoni tal-gass;

d) Apparat għal kontroll u l-kejl tan-nixxija ta' l-arja;

e) Apparat għat-tindig tad-diossidu tal-karbonju, għall-preparazzjoni ta' l-arja li hija ħielsa mid-dossidu tal-karbonju; jew b'mod alternattiv, taħlita ta' CO_2 ħieled mill-ossiġenu u CO_2 ħieles min-nitroġenu, minn ċilindri tal-gass fil-proporzjonijiet korretti (20 % O_2: 80 % N_2) jistgħu ikunu wżati;

(f) Apparat għad-determinazzjoni tad-diossidu tal-karbonju, jew b'mod titrimetriku jew inkella f'xi għala ta' l-analizzatur tal-karbonju mhux- organiku;

(g) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);

(h) Analiżattur DOC (voluntarju).

IV.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 10 ml tat-taħlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-taħlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

IV.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: ħama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u ħamrija jew minn taħlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

IV.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Bħala eżempju, il-volumi u l-piżijiet li ġejjin jindikaw il-valuri għal garafini ta' 5-litri li jkun fihom 3 litri ta' sospensjoni. Jekk volumi iżgħar ikunu wżati, immodifika l-valuri kif meħtieġ, imma assigura li d-diossidu tal-karbonju iffurmat jista jkun imkejjel bl-eżatezza.

Ma kull garafina ta' 5 litri żid 2 400 ml tal-medja minerali. Żid volum xieraq tal-ħama' attivata ippreparata (ara I.6.4.1 u I.6.5.) sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi ta' mhux aktar minn 30 mg/l fit-taħlita finali 3 l ta' l-inokulat. B'mod alternattiv, l-ewwel dewweb il-ħama' ippreparata sabiex takkwista sospensjoni ta' 500-1 000 mg/l fil-medja minerali qabel ma żżid alikwott mal-kontenuti tal-garafina ta' 5-litri sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' 30 mg/l; dan jassigura preċiżjoni akbar. Sorsi oħrajn ta' l-inoculum jistgħu ikunu wżati (ara I.6.4.2.).

Daħħal l-arja f'dawn it-taħlitiet tal- CO_2 ħieles mill-arja matul il-lejl sabiex titnaddaf is-sistema mid-diossidu tal-karbonju.

▼B

Żid il-materjal tat-test u s-sustanza ta' referenza, separatament, bħala volum magħruf tat-taħlitiet lesti, f'garafini kopji sabiex takkwista l-konċentrazzjonijiet, kontribwiti biż-żieda tal-kimika, ta' 10 sa 20 mg DOC jew TOC/l; ħalli wħud mill-garafini mingħajr iż-żieda tal-kimika bħala kontrolli ta' l-inoculum. Żid sustanzi tat-test li jinħallu bilmod direttament fil-garafini u iżen jew ikkalkula il-bażi tal-volum u opera kif deskritt fl-Anness III.

Jekk meħtieġ, uża garafina waħda sabiex tivverifika l-effett inibitorju possibbli tat-kimika tat-test biż-żieda kemm tal-kimika tat-test u tar-referenza fl-istess konċentrazzjonijiet kif preżenti fil-garafini l-oħrajn.

Ukoll, jekk meħtieġ, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradat abjotikament bl-użu tat-taħlita mhux inokulata tal-kimika (ara I.6,6.). Sterilizza biż-żieda ta' sustanza tossika fil-konċentrazzjoni xierqa.

Wassal il-volumi tas-sospenzi fil-garafina kollha għal 3 litri biż-żueda ta' medja minerali li preċedentament mogħtija l-arja bi CO_2 ħieles mill-arja. B'mod operattiv, il-kampjuni jistgħu ikunu miġbura għall-analiżi DOC (ara l-Anness II.4(u/jew analiżi speċifika. Waħħal il-flixkien ta' l-assorbazzjoni mal-ħruġ tal-ġarafini.

Jekk ikun użat l-idrossidu tal-barju, waħħal tlett fliexken ta' l-assorbazzjoni, b'kull wieħed ikun fih 100 ml ta, 0,0125 M taħlita ta' l-idrossidu tal-barju, f'serje ta' garafini ta' 5-litri 'l wieħed. It-taħlita għandha tkun ħielsa mis-sulfat u l-karbonat preċipitat u s-saħħa tagħha għandhom ikunu determinati immedjatament qabel l-użu. Jekk ikun użat l-idrossidu tas-sodju, waħħal żewġ nasses, it-tieni taġixxi bħala kontroll għad-demostrazzjoni li d-diossidu tal-karbonju kollu kien assorbit fl-ewwel wieħed. Fliexken ta' l-assorbazzjoni mgħammra b'għeluq tal-flixkun tas-serum huma adatti. Żid 200 ml 0,05 M idrossidu tas-sodju ma kull flixkun, li huwa suffiċjenti sabiex jassorbixxi l-kwantità totali tad-diossidu tal-karbonju evolut meta l-kimika tat-test tkun kompletament degradata. It-taħlita ta' l-idrossi tas-sodju, anki meta ippreparata friska, ikun fiha traċċi tal-karbonati, dan huma ikkorreġut bit-tnaqqis tal-karbonat fl-imbjank.

IV.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garafini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Garafina 5: Proċedura tal-kontroll u,

preferibbilment u meta meħtieġ:

Garafina 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Garafina 7: Kontroll tat-tossiċità

Garafina 8: Kontroll tat-tossiċità Ara wkoll I.6.7.

IV.2.6. **It-twettieq tat-test**

Ibda t-test bit-tbaqbieq ta' CO_2 ħieles mill-arja matul is-sospenzjoni bir-rata ta' 30-100 ml/min. Iġbor il-kampjuni ta' l-assorbent diossidu tal-karbonju perjodikament għall-analiżi tal-kontenut CO_2. Matul l-ewwel għaxart ijiem huwa rakkomndat li l-analiżi għandha tkun imwettqa fit-tieni jew fit-tielet jum u imbagħad kull ħames jum sat-28 jum ħekk li l-perijodu ta' l-10 ijiem jista jkun identifikat.

▼B

Fit-28 jum, iġbor il-kampjuni (voluntarja) għall-analiżi DOC u/jew speċifika, kejjel il-pH tas-sospenzjoni u żid 1 ml ta' l-aċidu idrokloriku ikkonċentrar ma kull garafina; agħti l-arja lill-garafini matul il-lejn sabiex twarrab id-diossidu tal-karbonju preżenti fis-sospenzjonijiet tat-test. Fil-jum 29 agħmel l-aħħar analiżi tad-diossidu tal-karbonju evolut.

Fil-jiem tal-kejl ta' CO_2, aqla l-assorbatur ta' l-idrossidu tal-barju l-ebreb lejn il-garafina, ittitra t-taħlita ta' l-idrossidu bi HCl 0,05 M bl-użu tal-fenilftalejn bħala indikatur. Mexxi l-assorbaturi li jkun fadat post aktar qrib tal-garafina u poġġi assorbatur ġdid li jkun fih 100 ml ta' l-idrossidu tal-barju frisk 0,0125 M fit-tarf imbiegħed tas-serje. Wettaq titrazzjonijiet kif meħtieġ, per eżempju, meta l-preċipitazzjoni sostanzjali hija murija fl-ewwel nassa u qabel ma jkun evidenti fit-tieni, jew mill-anqas darba fil-ġimgħa. B'mod alternattiv, bi NaOH bħala assorbatur, iġbed b'siringa kampjun żgħir (jiddependi mill-karatteristiċi ta' l-analizzatur tal-karbonju użat) tat-taħlita ta' l-idrossidu tas-sodju fl-assorbatur l-eqreb lejn il-garafina. Injetta direttament il-kampjun fil-parti IC ta' l-anilizzatur tal-karbonju għall-analiżi tad-diossidu tal-karbonju evolut.

Analizza l-kontenuti tat-tieni nassa biss fit-tmiem tat-test sabiex tikkorieġi għal xi ammont żejjed tad-diossidu tal-karbonju.

IV.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

IV.3.1. **Trattament tar-riżultati**

L-ammont ta' CO_2 fin-nassa ta' l-assorbatur meta ittrat huwa mogħti bi:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

meta:

V = il-volum ta' HC1 użat għat-titrazzjoni tal-100 ml fl-assorbatur (ml).

C_B = il-konċentrazzjoni tat-taħlita ta' l-idrossidu tal-barju (M),

C_A = l-konċentrazzjoni tat-taħlita ta' l-aċidu idrokloriku (M),

jekk C_B jkun 0,0125 M u C_A huwa 0,05 M, it-titrazzjoni għal 100 ml idrossidu tal-barju hija 50 ml u l-piż ta' CO_2 huwa mogħti bi:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrated} = 1,1 \times \text{ml HCI}$$

Hekk, f'dan il-każ, sabiex il-volum ta' HC1 titrat ikun ikkopnvertit għal mg tas-CO_2 prodott, il-fattur huwa 1,1.

Ikkalkola l-piżijiet ta' CO_2 prodott biss mill-inoculum u mill-iconulum flimkien mal-kimika tat-test bl-użu tal-valuri rispettivi tat-titrazzjoni u d-differenza fil-piż ta' CO_2 prodott biss mill-kimika tat-test.

Per eżempju, jekk l-inoculum biss jagħti titrazzjoni ta' 48 ml u l-inoculum flimkien mal-kimika tat-test jagħti 45 ml,

CO_2 mill-inoculum = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 mill-inoculum flimkien mal-kimika tat-test = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

u bhekk il-piż ta' CO_2 prodott mill-kimika tat-test hija 3,3 mg.

Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat minn:

$$\% \text{ degradażżjoni} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ prodott} \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg kimika tat} - \text{test miżjuda}}$$

jew,

$$\% \text{ degradażżjoni} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ prodott} \times 100}{\text{mg TO miżjud mit} - \text{test} \times 3,67}$$

3,67 ikun il-fattur tal-konverżjoni (44/12) għall-karbonju tad-diossidu tal-karbonju.

Akkwista l-persentaġġ tad-degradazzjoni wara kwalunkwe intervall ta' ħin biż-żieda tal-persentaġġ tal-valuri $ThCO_2$ ikkalkolat għal kull waħda mill-jiem, sa dak il-ħin, li fih ikun imkejjel.

Għall-assorbaturi idrossidu tas-sodju, ikkalkola l-ammont tad-diossidu tal-karbonju prodott, espressa bħala IC (mg), bil-moltiplikazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' IC fl-assorbent bil-volum ta' l-assorbent.

Ikkalkula l-persentaġġ tad-degradazzjoni minn:

$$\% \text{ of } ThCO_2 = \frac{\text{mg IC garafina} - \text{mg IC imbjank}}{\text{MG TOC miżjud bħala kemikali għat} - \text{test}} \times 100$$

Ikkalkola DOC imneħħija (voluntarja) kif deskritt taħt 1.7. Irreġistra dawn u r-riżultati l-oħrajn kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

IV.3.2. **Validità tar-riżultati**

Il-kontenut IC tas-sospenzjoni tal-kimika tat-test fil-medja minerali fil-bidu tat-test għandu jkun anqas minn 5 % tal-TC, u t-total CO_2 ta' l-evoluzzjoni ta' l-inoculum fl-imbjank fit-tmiem tat-test għandu normalment jeċċedi 40 mg/l medja. Jekk valuri akbar minn 70 mg CO_2/litru jkunu akkwistati, id-data u t-teknika sperimentali għandha tkun eżaminata b'mod kritiku.

Ara wkoll I.5.2.

IV.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

IV.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST TA' L-EVOLUZZJONI TAD-DIOSSIDU TAL-KARBONJU

(1) **LABORATORJU**

(2) **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

(3) **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru bħala kimika

▼B

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja: mg/litru bħala kimika

Total C miżjud mal-garafina: mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/litru

Ħin (jum)	CO_2 iffurmat Test (mg)		CO_2 iffurmat imbjank (mg)		CO_2 iffurmat Kumulattiv (mg) (Il-medja ta' l-imbjank *minus* tat-test)		$ThCO_2$ Kumulattiv $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	medja	3 / 4	medja	1	2	1	2	medja
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Nota: formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità

6. **ANALIŻI TAL-KARBONJU** (voluntarju)

Analizzatur tal-karbonju:

Żmien (jiem)	Imbjank mg/l	Kimika tat-test mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) jew fl-aħħar ta' l-inkubazzjoni.

▼B

$$\% \text{ DOC imneħħi} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADAZZJONI ABJOTIKA** (voluntarja)

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{CO_2 \text{ il} - \text{formazzjoni f 'garafina sterlili wara 28 jum (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

PARTI V. **TEST TAR-RESPIROMETRIJA MANJOMETRIKA** (Metodu C.4-D)

V.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata, li jkun fiha konċentrazzjoni magħrufa tal-kimika tat-test (100 mg/litru tas-sustanza tat-test, li tagħti mill-anqas 50-100 mg ThOD/litru) bħala s-sorsi unika nominali tal-karbonju organiku, hija mħawwda f'garafina magħluqa f'temperatura kostanti (± 1 ºC jew eqreb) għal sa 28 jum. Il-konsum ta' l-ossiġenu huwa determinat jew bil-kejl tal-kwanità ta' ossiġenu (prodott b'mod elettolitiku) meħtieġ għaż-żamma tal-volum tal-gass fil-garafina respirimetru, jew bit-tibdil fil-volum jew fil-pressjoni (jew ġemgħa tat-tnejn) fl-apparat. Id-diossidu tal-karbonju evolu huwa assorbit fit-taħlita ta' l-idrossidu tal-putassa jew f'xi assorbent xieraq ieħor. L-ammont ta' ossiġenu akkwistat bil-kimika tat-test (ikkorreġut għall-akwista mill-inoculim fl-imbjank, imwettaq b'mod parallel) huwa espress bħala persentaġġ ta' ThOD jew COD. B'mod voluntarju, il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, u fl-aħħar mill-aħħar il-biodegredazzjoni bl-analiżi DOC..

V.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

V.2.1. **Apparat**

a) respirometru xieraq;

b) kontroll tat-temperatura, żamma ta' ± 1 ºC jew aħjar;

ċ) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);

d) analizzatur tal-karbonju (voluntarju).

V.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 10 ml tat-taħlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-taħlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

V.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: ħama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u ħamrija jew minn taħlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

V.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Ipprepara t-taħlitiet għat-test u l-kimika tar-referenza, f'lottijiet separati, f'medja minerali ekwivalenti għal konċentrazzjoni, normalment, ta' 100 mg kimika/litru (li tagħti mill-anqas 50-100 mg ThOD/litru), bl-użu tat-taħlitiet bil-lest.

▼B

Ikkalkola il-ThOD fuq il-bażi tal-formazzjoni ta' l-imluħa ta' l-ammonium, sakemm nitrifikazzjoni tkun antiċipata, meta l-kalkolazzjoni għandha tkun ibbażata fuq il-formazzjoni nitrika (ara l-Anness II.2.)

Iddetermina l-valuri pH u aġġusta, jekk meħtieġ, għal 7,4. ± 0,2.

Sustanzi li ma tantx jinħallu għandhom ikunu miżjuda fi stadju aktar tard (ara hawn taħt).

Jekk it-tossiċita tal-kimika tat-test għandha tkun determinata, ipprepara taħlita oħra fil-medja minerali li jkun fiha kemm il-kimika tat-test u tar-referenza fl-istess konċentrazzjonijiet bħal fit-taħlitiet individwali.

Jekk il-kejl tat-teħid fiżiku-kimiku ta' l-ossiġenu huwa meħtieġ, ipprepara taħlita tal-kimika tat-test fi, mormalment, 100 mh ThOD/-litru li tkun ġiet sterilizzata biż-żieda ta' sustanza tassika adatta (ara I.6,6.).

Introduċi l-volum meħtieġ tat-taħlitiet tal-kimika tat-test u ta' referenza, rispettivament, mill-anqas fil-garafini duplikati. Żid ma garafini oħrajn il-medja minerali biss (għal kontrolli ta' l-inoculum) u, jekk meħtieġ, it-taħlita tal-kimika tat-test imħallta/ta' referenza, u t-taħlita sterili.

Jekk il-kimika tat-test ma tantx tkun tinħall, żid sustanzi tat-test li jinħallu bil-mod direttament fil-garafini u iżen jew ikkalkula l-bażi tal-volum u opera kif deskritt fl-Anness III. Żid l-idrossidu tal-putazza, gerbubi tal-ġir tas-soda jew assorbent ieħor mal-kompartimenti assorbatur CO_2.

V.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garafini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Il-garafini 5: Proċedura tal-kontroll preferibbilment, u meta meħtieġ:

Il-garafini 6: Kontroll sterili

Il-garafini 7: Kontroll tat-tossiċità

Il-garafini 8: Kontroll tat-tossiċità

Ara wkoll I.6.7.

V.2.6. **It-twettieq tat-test**

Ħalli l-garafini jilħqu t-temperatura mixtieqa u inokula r-reċipjenti xierqa bil-ħama' attivata ippreparata jew b'sors ieħor ta' l-inoculum sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi ta' mhux aktar minn 30 mg/litru. Ħejji l-apparat, qabbad il-ħawwadi u ivverifika li ma tgħaddix arja, u ibda bil-kejl tat-teħid ta' l-ossiġenu. Normalment l-ebda attenzjoni oħra m'hija meħtieġa apparti milli t-teħid tal-qari u tal-virifika odjerna sabiex tara li t-temperatura korretta u t-taħwis adekwat ikun mantenut.

Ikkalkola t-teħid ta' l-ossiġenu mill-qari meħuda f'intervalli regolati u ta' spiss, bl-użu tal-motodi rakkomandati mill-manifattur ta' l-apparat. Fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, normalment 28 jum, kejjel il-pH tal-kontenuti tal-garafini, speċjalment jekk it-teħid ta' l-ossiġenu jkun baxx jew aktar minn $ThODNH_4$ (għal komposti li jkun fihom in-nitroġenu).

▼B

Jekk meħtieġ, neħħili l-kampjuni mill-garafini respirometri, inizjalment u finalment, għall-analiżi ta' DOC jew kimika speċifika (ara l-Anness II.4). Fit-tneħħija inizjali, assigura li l-volum tassospensjoni tat-test li jkun baqa' fil-garafina, jkun magħruf. Meta l-ossiġenu jkun meħud mis-sustanza tat-test li jkun fiha l-N, iddetermina ż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat u wettaq innitrazzjoni matul 28 jum u ikkalkola l-korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni (l-Anness V).

V.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

V.3.1. **Trattament tar-riżultati**

Iddividi l-akkwista ta' l-ossiġenu (mg) tal-kimika tat-test wara ħin pre-determina (korreġut għal dak ta' l-inoculum tal-kontroll fl-imbjank wara l-istess ħin) bil-piż tat-kimika tat-test kif użata. Dan iforni il-BOD espress bħala mg ossiġenu/mg kimika tat-test, iġiefiri

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ teħid bil} - \text{kimika tat} - \text{test} - \text{mg O}_2 \text{ teħid bl}-))}{(\text{mg kimika tat} - \text{test fil} - \text{garafina})}$$

mg O_2 kull mg kimika tat-test

ikkalkola l-persentaġġ tal-biodegradazzjoni jew minn:

$$\%\ \text{bijodegradazzjoni} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD(mg O}_2\text{/mg kemikali)}}{\text{ThOD(mg O}_2\text{ kemikali)}} \times 100$$

Jew inkella minn:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD(mg O}_2\text{/mg kemikali)}}{\text{COD(mg O}_2\text{ kemikali)}} \times 100$$

Għandu jkun innotat li dawn iż-żewġ metodi mhux neċessarjament jagħtu l-istess valur, huwa preferibbli li jsir użu mill-metodu preċedenti.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom in-nitroġenu, għamel użu mill-ThOD xieraq (NH_4 jew NO_3) skond ma jkun magħruf jew mistenni dwar l-okkorrenza tan-nitrifikazzjoni (l-Anness II.2). Jekk in-nitrifikazzjoni isseħħ imma ma tkun kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

Meta determinazzjonijiet voluntarji tal-karbonju organiku u/jew ta' kimika speċifika jkun saru, ikkalkola il-persentaġġ tad-degradazzjoni, kif deskritt taħt I.7.

Irreġistra r-riżultati kollha dwara id-data fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

V.3.2. **Validità tar-riżultati**

It-teħid ta' l-ossiġenu ta' l-inoculum fl-imbjank normalment huwa 20-30 mg O_2/litru u m'għandux ikun aktar minn 60 mg/litru fi 28 jum. Valuri għola minn 60 mg/litru jkunu jeħtieġu eżaminazzjoni kritika tad-data u tat-tekniki sperimentali. Jekk il-valur tal-pH huwa l-barra mill-medda 6-8, 5 u l-konsum ta' l-ossiġenu bil-kimika tat-test huwa anqas minn 60 %, it-test għandu jkun repetut b'konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test.

Ara wkoll I.5.2.

▼B

V.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

V.4. **FOLJA TAD-DATA**

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST RESPIRATORJU MANOMETRIKU

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, C_o: mg/litru

Volum fil-garafina tat-test (V): ml

ThOD jew COD: mg O_2/mg sustanza tat-test (NH_4, NO_3)

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/l

5. **TEĦID TA' L-OSSIĠENU BIODEGRADABBILITÀ**

		Jum											
		0		7		14			21			28	
O_2 upt. (mg), kimika tat-test	1												
	2												
	a, medja												
O_2 upt. (mg) imbjank	3												
	4												
	b, medja												
BOD(mg) ikkorreġut	(a_1-b_m)												
	(a_2-b_m)												
BOD kull mg tal-kimika tat-test	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Jum											
		0		7		14			21			28	
% degradazzjoni $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Medja (*)												

V = Volum tal-medja fil-garafina tat-test
(*) D_1 u D_2 m'għandhiex tittieħed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

N.B.: Formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

6. **KORREZZJONI GĦAN-NITRIFIKAZZJONI** (ara l-Anness V)

Jum		0	28	Differenza
(i)	Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)			(N)
(ii)	Ossiġenu ekwivamenti (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)			(N)
(iv)	Ossiġenu ekwivamenti (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Ossiġenu ekwivamenti totali	—	—	

7. **ANALIŻI TAL-KARBONJU** (volontarju)

Analizzatur tal-karbonju:

Żmien (jiem)	mg/litru fl-imbjank	Kimika tat-test mg/litru
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) jew fl-aħħar ta' l-inkubazzjoni.

$$\% \text{ DOC imneħħi} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **KIMIKA SPECIFIKA** (volontarja)

S_b = konċentrazzjoni fil-fiżiko0kimika (sterili) mal-kontroll ta' 28 jum

S_a = konċentrazzjoni fil-garafina inokulta fi 28 jum.

$$\% \text{ biodegradazzjoni} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADAZZJONI ABJOTIKA** (voluntarja)

a = konsum ta' l-ossiġenu f'garafini sterili wara 28 jum, (mg)

$$\text{konsum ta}' \text{ l} - \text{ossiġenu ghall kull mg tal} - \text{kimika tat} - \text{test} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(ara s-sezzjonijiet 1 u 3)

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

PARTI VI. **TEST TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ** (Metodu ºC.4-E)

VI.1. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-taħlita tal-kimika tat-test f'medja minerali, normalment fi 2-5 mg/litru, hija inokulata b'relattivament numru żgħir ta' mikro-organiżmi minn popolazzjoni mħallta u miżmuma fi fliexken, kompletament mimlija u magħluqa, fid-dlam u f'temperatura kostanti. Id-degradazzjoni hija segwita bl-analiżi ta' l-ossiġenu maħlul matul perijodu ta' 28 jum. L-ammont ta' ossiġenu akkwistat bil-kimika tat-test, ikkorreġut għall-akwista mill-inoculim fl-imbjank, imwettaq b'mod parallel, huwa espress bħala persentaġġ ta' ThOD jew COD.

VI.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

VI.2.1. **Apparat**

a) Fliexken BOD, b'tappini tal-ħġieġ, eż. 250-300 ml;

b) Banju ta' l-ilma jew inkubatur, għaż-żamma tal-fliexken f'temperatura kostanti (± 1 ºC jew aħjar) bl-esklużjoni tad-dawl;

ċ) Fliexken tal-ħġieġ kbar (2-5 litri) għall-preparazzjoni tal-medja u għall- mili tal-fliexken BOD;

d) Elettrodu u arloġġ ta' l-ossiġenu, jew apparat u reaġenti għat-titrazzjoni Winker.

VI.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-taħlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Ħawwad 1 (wieħed) tat-taħlita (a) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-taħwid.

VI.2.3. **Preparazzjoni ta' l-inoculum**

L-inoculum huwa normalment akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Sors alternattiv ieħor għall-inoculum hija l-ilma tal-wiċċ ta' l-art. Normalment l-użu huwa ta' taqtira waħda (0,05 ml) ma 5 ml tal-filtrat għal kull litru tal-medja; il-provi jistgħu jeħtieġ li jiskopru l-aħjar volum għal effluwent partikolari (ara I.6.4.2. u I.6.5.).

VI.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

B'mod qawwi daħħal l-arja f'medja minerali għal mill-anqas 20 minuta. Wettaq kull waħda mis-serje tat-testijiet bil-medja akkwistata mill-istess lott. Ġeneralment, il-medja hija lesta għall-użu wara li tkun qagħdet għal 20 siegħa, fit-temperatura tat-test. Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb għall-iskopijiet tal-kontroll; il-valur għandu jkun madwar 0 mg/litru fi 20 ºC. Wettaq l-operazzjonijiet kollha tat-trasferiment u tal-mili tal-medja saturata bl-arja imma mingħajr bżieżaq, per eżempju, bl-użu ta' sifuni.

▼B

Ipprepara grupp paralelli ta' fliexken BOD għad-determinazzjoni tat-test u l-kimika ta' referenza f'serje sperimentali simultanji. Organizza numru suffiċjenti tal-flixkien BOD, inkluži l-inoculum fl-imbjank, sabiex tippermetti mill-anqas kejl duplikat tal-konsum ta' l-ossiġenu li jsir matul l-intervalli mixtieqa tat-test, per eżempju, wara 0, 7, 14, 21 u 28 jum. Sabiex tassigura li tkun tista tidentifika l-perijodu ta' l-10 ijiem, aktar fliexken jistgħu ikunu meħtieġa.

Żid medja minerali mimlija kollha bl-arja ma fliexken kbar hekk li jkunu mimlija għal madwar terz. Imbagħad żid taħlitiet bil-lest suffiċjenti tal-kimika tat-test u tal-kimika ta' referenza sabiex tissepara l-flixken il-kbar hekk l-konċentrazzjoni finali tal-kimika tkun normalment mhux akbar minn 10 mg/litru. M'għandhek iżżid l-ebda kimika ma l-imbjank fil-medja tal-kontroll li tkun fi flixkun kbir ieħor.

Sabiex tassigura li l-attività ta' l-inoculum ma tkunx limitata, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb m'għandhiex tinżel aktar baxxa minn 0,5 mg/litru fil-fliexken BOD. Dawn jillimitaw il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test għal madwar 2 mg/litru. B'dana kollu, għal komposti b'degradibbiltà baxxa u dawk bi ThOD baxxa, 5-10 mg/litru jistgħu ikunu wżati. F'uħud mill-każi, ikun rakkommandabbli li twettaq b'mod parallel serje tal-kimika tat-test f'żewġ konċentrazzjonijiet differenti, per eżempju, 2 u 5 mg/litru. Normalment, għandhek twettaq il-kalkolu tal-ThOD fuq il-bażi tal-formazzjoni tal-melħ ta' l-ammonium, imma, jekk in-nitrifikazzjoni tkun mistennija jew ikun magħruf li sseħħ, agħmel il-kalkolu fuq il-bażi tal-formazzjoni tan-nitrat ($ThOD_{NO3}$: ara l-Anness II.2). B'danakollu, jekk in-nitrifikazzjoni ma tkunx kompluta imma isseħħ, għamel korrezzjoni għat-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat, determinati fl-analiżi, (ara l-Anness V).

Jekk it-tossiċità tal-kimika tat-test għandha tkun investigata (fil-każ, per eżempju, tal-valur preċedenti baxx tal-biodegradabbiltà li jkun ġie misjub), serje oħra ta' flixkien hija neċessarja.

Ipprepara flixkun kbir ieħor li jkun fih medja minerali bl-arja (sa madwar terz tal-volum tiegħu) flimkien mal-kimika tat-test u l-kimika ta' referenza fil-konċentrazzjoni finali normalment l-istess bħal dawk fil-fliexken kbar l-oħrajn.

Inokula t-taħlitiet fil-fliexken il-kbar b'effluwent sekondarju (qatra waħda jew madwar 0,05 ml, ma 5 ml/litru) jew b'sorsi oħra bħal ma hu l-ilma tax-xmara (ara I.6.4.2.). Finalment, wassal it-taħlitiet għall-volum b'medja minerali bl-arja bl-użu ta' manka li tilħaq sal-qiegħ tal-flixkun sabiex takkwista taħlita adekwata.

VI.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Fi prova tipika, il-fliexken li ġejjin huma wżati:

— mill-anqas 10 li jkun fihom il-kimika tat-test u ta' l-inoculum (sospenzjoni tat-test),

— mill-anqas 10 li jkun fihom biss l-inoculum (inoculum fl-imbjank),

— mill-anqas 10 li jkun fihom il-kimika ta' referenza u ta' l-inoculum (kontroll tal-proċedura),

▼B

— u, meta meħtieġ, 6 fliexken li jkun fihom il-kimika tat-test, kimika ta' referenza u l-inoculum (kontroll tat-tossiċità). B'dana kollu, sabiex tassigura li tkun tista tidentifika l-perijodu ta' l-10 ijiem, madwar id-doppju ta' fliexken jistgħu ikunu meħtieġa.

VI.2.6. It-twettieq tat-test

Forni kull taħlita ippreparata immedjetament ġewwa kull grupp rispettiv tal-fliexken BOD bil-manka mill-kwart tl-isfel (mhux mill-qiegħ) tal-flixkun kbir xieraq, hekk li l-fliexken BOD kollha jkunu kompletament mimlija. Taptap bil-ġentilizza sabiex tneħħi xi bżieżaq ta' l-arja. Analiżża il-fliexken ħin-żero immedjetament għall-ossiġenu mdewweb bil-metodi Winkles jew bl-elettrodi. Il-kontenuti tal-fliexken jistghu jkunu preservati għal analiżi aktar tard bil-metodu Winkles biż-żieda tal-manganiż (II) sulfat jew idrossidu tas-sodju (l-ewwel reaġent Winkler). Aħżen bil-galbu l-fliexken magħluqa bl-istopponi, li jkun fihom l-ossiġentu iffissat bħala manganiż kannella (III) ossidu idrat, fid-dlam fi 10-20 °C għal mhux aktar minn 24 siegħa qabel ma tipproċedi bil-kumplament tal-passi tal-metodu Winkler. Agħmel it-tappini fuq il-kumplament tal-flixkien, tassigura li l-ebda bżieżaq ta' l-arja ma jkunu magħluqa, u inkuba fi 20 °C fid-dlam. Kull serja għandha tkun akkumpanjata b'serje paralella sħiħa għad-determinazzjoni tal-medja in-bjank inokulata. Neħħi mill-anqas il-flixkien duplikati tas-serje kollha għall-abaliżi ta' l-ossiġenu mdewweb matul l-intervalli tal-ħin (mill-anqas kull ġimgħa) matul it-28 jum ta' l-inkubazzjoni.

Kampjuni ta' kull ġimgħa għandhom jippermettu l-assessjar tat-tneħħija perċentwali fil-perijodu ta' 14-il jum, fil-waqt li l-kmpjunar ta' kull 3-4 ijiem għandu jippermetti li l-perijodu ta' 10 ijiem li jkun identifikat, li jkun jeħtieġ madwar id-doppju ta' tant fliexken.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom N, korrezzjonijiet għat-teħid ta' l-ossiġenu minn xi nitrifikazzjoni li sseħħ, għandu jsir. Sabiex isir dan, uża l-metodu ta' l-elettrodi-O_2 għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb u imbagħad warrab il-kampjun mill-flixkun BOD għall-analiżi tan-nitrit u n-nitrat. Miż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat, wettaq il-kalkolu ta' l-ossiġenu użat (ara l-Anness V).

VI.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

VI.3.1. **Trattament tar-riżultati**

L-ewwel agħmel il-kalkolu tal-BOD eżerċitat wara kull perijodu ta' żmien billi tnaqqas l-eżawriment ta' l-ossiġenu (mg O_2/litru) ta' l-inoculum fl-imbjank minn dak esibit bit-test kimiku. Iddividi dan l-eżawriment ikkorreġut bil-konċentrazzjoni (mg/litru) tal-kimika tat-test, sabiex takkwista l-BOD speċifika vġama mg ossiġenu kull mg tal-kimika tat-test. Wettaq il-kalkolu tal-persentaġġ tal-biodegradabbiltà billi tiddividi l-BOD speċifika bil-ThOD speċifika (ikkalkolata skond l-Anness II,2) jew il-COD (determinata bl-analiżi, ara l-Anness II.3),b'hekk:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ teħid bil} - \text{kimika tat} - \text{test} - \text{mg } O_2 \text{ teħid bl} - \text{imbjank})}{(\text{mg kimika tat} - \text{test fil} - \text{garafina})}$$

▼B

mg O_2 kull mg tal-kimika tat-test

$$\% \text{ biodegradazzjoni} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikali għat} - \text{test)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg kemikali għat} - \text{test)}} \times 100$$

jew

$$\% \text{ degradation} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikali għat} - \text{test)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg kemikali għat} - \text{test)}} \times 100$$

Għandu jkun innotat li dawn iż-żewġ metodi mhux neċessarjament jagħtu l-istess valur, huwa preferibbli li jsir użu mill-metodu preċedenti.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom in-nitroġenu, għamel użu mill-ThOD xieraq (NH_4 jew NO_3) skon ma jkun magħruf jew mistenni dwar l-okkorrenza tan-nitrifikazzjoni (l-Anness II.2). Jekk in-nitrifikazzjoni isseħħ imma ma tkun kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

VI.3.2. **Validità tar-riżultati**

L-eżawriment ta' l-ossiġenu mill-imbjank ta' l-inoculum m'għandux jeċċedi 1,5 mg ossiġenu mdewwb/litru wara 28 jum. Valuri għola minn dan jeħtieġu investigazzjoni tat-tekniki sperimental. Il-konċentrazzjoni residwa ta' l-ossiġenu fil-fliexken tat-test m'għandhiex tinżel għal anqas minn 0,5 mg/litru fi kwalunkwe żmien. Livelli hekk baxxi ta' l-ossiġenu huma validi biss jekk il-metodu għad-determinazzjoni ta; l-ossiġenu mdewweb tkun tista tkejjel tali livella bl-akbar eżatezza.

Ara wkoll I.5.2.

VI.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

VI.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru

Konċentrazzjoni inizjali fil-flixkun: mg/litru

ThOD jew COD: mg O_2/mg sustanza tat-test

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

▼B

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni fit-taħlita tar-reazzjoni: mg/litru

5. **DETERMINAZZJONI DO**

Metodu: Winkler/elettrodu

L-analiżi tal-garafini

Iż-żmien ta' l-inkubazzjoni (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Imbjank (mingħajr kimika)	1	C_1				
	2	C_2				
Medja	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Kimika tat-test	1	a_1				
	2	a_2				
Medja	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Nota: Formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kompost tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

6. **KORREZZJONI GHAN-NITRIFIKAZZJONI** (ara l-Anness V)

Iż-żmien ta' l-inkubazzjoni (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)				
(ii)	Tibdil tal-konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)	—			
(iii)	Ossiġenu ekwivalenti (mg/litru)	—			
(iv)	Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)				
(v)	Tibdil tal-konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)	—			
(vi)	Ossiġenu ekwivalenti (mg/litru)	—			
(iii + vi)	Ossiġenu totali ekwivalenti (mg/litru)	—			

7. **EŻAWRIMENT DO: % DEGRADAZZJONI**

	Degradazzjoni wara jiem n (mg/litru)			
	n_1	n_2	n_3	
GARAFINA 1: $(m_{to} - {}_{mtx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
GARAFINA 2: $(m_{to} - {}_{mtx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Degradazzjoni wara jiem n (mg/litru)			
	n_1	n_2	n_3	
GARAFINA 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konk tat} - \text{test ThOD kemikali}}$				
GARAFINA 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konk tat} - \text{test ThOD kemikaliof test} \times \text{ThOD chemical}}$				
$\% D \text{ medja } (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) bħala kondizzjoni stabbli(medja)

m_{to} = alur fil-garafina tat-test fil-ħin 0

m_{tx} = alur fil-garafina tat-test fil-ħin x

m_{bo} = l-valur medju ta' imbjank fil-ħin 0

m_{bx} = il-valur medju ta' imbjank fil-ħin x

Applika wkoll il-korrezzjoni għan-nitrifikazzjoni minn iii+vi fis-sezzjoni 6.

8. **EŻAWRIMENT DO IMBJANK**

Konsum ta' l-ossiġenu fl-imbjank: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/litru Dan il-konsum huwa importanti għall-validità tat-test. Dan għandu jkun anqas minn 1,5 mg/litru.

PARTI VII. **TEST M.I.T.I.** (Metodu ºC.4-F)

VII.1. PRINĊIPJUTAL-METODU

It-teħid ta' l-ossiġenu bit-taħlita mħawda, jew bis-sospensjoni, tal-kimika tat-test f'medja minerali, inokulata b'mikro-organiżmi speċjalment imkabbra, mhux adattati, hija mkejla awtomatikament matul perijodu ta' 28 jum f'respirometri magħluq u fid-dlam fi 25 ± 1 ºC. Id-disossidu tal-karbonju evolut huwa assorbit bil-ġir tassoda. Il-biodegradabbiltà hija espressa bħala persentaġġ tat-teħid ta' l-ossiġenu (ikkorreġut għat-teħit fl-imbjank) tat-teħid teoretiku (ThOD). Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, u fl-aħħar mill-aħħar il-biodegredazzjoni bl-analiżi DOC.

VII.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

VII.2.1. **Apparat**

a) Arloġġ BOD elettroliku awtomatiku jew respirometru normalment mgħammar b'6 fliexken, 300 ml il-wieħed, u mgħammar b'kikkri sabiex ikun fihom l-assorbent CO_2;

▼B

b) Kamra ta' temperatura kostanti u/jew banju ta' l-ilma fi 25 °C ± 1 °C jew aħjar;

ċ) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);

d) analiżattur tal-karbonju (voluntarju).

VII.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Ipprepara t-taħlitiet bil-lest li ġejjin, bl-użu ta' reaġenti ta' grad analitiku u l-ilma (I.6.1.):

a)	Monopotassium dihydrogen ortho phosphate, KH_2PO_4	8,50 g
	Dipotassium monohydrogen ortho phosphate, K_2HPO_4	21,75 g
	Disodium monohydrogen ortho phosphate dodecahydrate Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Klorid ta' l-ammonium, NH_4Cl	1,70 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	
	Il-valur pH tat-taħlita għandu jkun 7,2	
b)	Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru	
c)	Klorid tal-kalċji, anidriju, $CaCl_2$	27,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	
d)	Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	

Ħu 3 ml ta' kull taħlita (a), (b), (c) u (d) u wassal sa litru.

VII.2.3. **Preparazzjoni ta' l-inoculum**

Iġbor kampjuni friski minn mhux anqas minn għaxar siti, l-aktar minn żoni ta' fejn varjetà ta' kimiċi huma użati u mormija. Minn siti bħalma huma l-impjanti tat-trattament tad-drenaġġ, trattament ta' l-iskart industrijali, xmajjar, għadajjer, ibħra, iġbor litru tal-kampjun u tal-ħama', ħamrija tal-wiċċ, ilma, eċċ., u ħallat sewwa flimien. Wara li tneħħi l-materja li jkun hemm fil-wiċċ u tħalli li joqgħod, aġġusta s-supernatant għal pH 7 ± 1 bl-idrossidu tas-sodju u l-aċidu fosforiku.

Uża l-volum xieraq mas-supernayant iffiltrat sabiex timla reċipjent tal-"mili u ġbir" tal-ħama' attivata u agħti l-arja lil-likwidu għal madwar 231/2 siegħat. Tletin minuta wara li tkun waqfet l-arjazzjoni, warrab madwar terż tal-volum kollu tas-supernatant u żid volum egwali tat-taħlita (pH 7) li jkun fiha 0,1 % kull wieħed tal-glukożju, peptun, u monoputassa orto fosfat, mal-materja li tkun qagħdet u erġa ibda bl-arjazzjoni. Irrepeti din il-proċedura darba kuljum. L-unità tal-ħama' għandha tkun operata skond il-prattika tajba: l-effluwenti għandhom ikunu ċari, t-temperatura għandha tinżamm fi 25 ± 2 C, il-pH għandu jkun 7 ± 1, il-ħama' għandha tkun qagħdet sewwa, b'arjazzjoni suffiċjenti sabiex iżżomm it-taħlita erobika matul il-ħin kollu, il-protażoa għandha tkun preżenti u l-attività tal-ħama għandha tkun ittestjata kontra sustanza ta' referenza mill-anqas darba kull tlett xhur. Tutilizzax il-ħama' bħala inoculum sa mill-anqas xahar wieħed mill-operazzjoni, imma mhux aktar tard minn erba' xhur. Minn hemm 'il quddiem, iġbor kampjun minn mill-anqas 10 siti matul intervelli regolari, darba kull tlett xhur.

▼B

Sabiex iżżomm kemm il-ħama' friska u dik antika fl-istess attività, ħawwad is-supernatant iffiltrat ta' ħama' attivata bl-użu ta' volum egwali tas-supernatant iffiltrat mat-taħlita ta' l-għaxar sorsi miġbura friski u wettaq il-kultura ta' dak il-likwir miġmugħ kif deskritt hawn fuq. Iġbor il-ħama' għall-użu bħala inoculum 18-24 siegħa wara liu l-unita tkun ġiet mimlija.

VII.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Ipprepara dawn is-sitt garafini kif ġejjin:

Nru. 1: kimika tat-test f'ilma mdewweb fi 100 mg/litru

Nru. 2, 3 u 4: kimika tat-test f'minerali mdewweb fi 100 mg/litru

Nru. 5: kimika tat-test (eż. analin) f'medja minerali mdewwba fi 100 mg/litru

Nru. 6: medja minerali biss

Żid il-kimika tat-test li ma tantx tinħall fuq il-bażi ta' piż jew volum jew ittratta kif deskritt fl-Anness III, apparti li la s-solventi u l-anqas l-aġenti emulsifikanti m'għandhom ikunu wżati. Żid l-assorbent tal-CO2 mal-garafini kollha fil-kikkri speċjali kif fornuti. Aġġusta l-pH fil-garafini nri. 2, 3 u 4 għal 7,0.

VII.2.5. **It-twettieq tat-test**

Inokulta l-garafini nri. 2, 3 u 4 (sospensjoni tat-test, nru. 5 (kontroll ta' l-attività) u nru. 6 (inoculum fl-imbjank) b'volum żghir ta' l-inoculum sabiex ikun hemm konċentrazzjoni ta' 30 mg/litru ta' solidi sospiżi. Inoculum N huwa miżjud mal-garafina nru. 1 li sservi bħala kontroll abjotiku. Ħejji l-apparat, qabbad il-ħawwadi u ivverifika li ma tgħaddix arja, u ibda bil-kejl tat-teħid ta' l-ossiġenu taħt kondizzjonijiet fid-dlam. Ivverifika ta' kuljum, it-temperatura, l-ħawwadi u r-reġistratur kowlometriku tat-teħid ta' l-ossiġenu, u innota xi kambjamenti fil-kulur tal-kontenuti tal-garafini. Aqra l-akkwist ta' l-ossiġenu għas-sitt garafini direttament bil-metodu xieraq, per eżempju, mill-grafika tar-reġistrazzjoni ta' sitt punti, li tipproduċi kurva BOD. Fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, normalment 28 jum, kejjel il-pH tal-kontenuti tal-garafini u iddetermina l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test residwa u xi intermedju u, fil-każ ta' sustanza li tinħall fl-ilma, il-konċentrazzjoni ta' DOC (l-Anness II.4). Agħti attenzjoni speċjali fil-każ ta' kimika volatili. Jekk nitrifikazzjoni tkun antiċipata, iddetermina l-konċentrazzjoni tan-nitrat u tan-nitrit, jekk dan ikun possibbli.

VII.3. DATA URAPPORTAĠĠ

VII.3.1. **Trattament tar-riżultati**

Iddividi l-akkwista ta' l-ossiġenu (mg) tal-kimika tat-test wara hin pre-determina (korreġut għal dak ta' l-inoculum tal-kontroll fl-imbjank wara l-istess ħin) bil-piż tat-kimika tat-test kif użata. Dan iforni il-BOD espress bħala mg ossiġenu/mg kimika tat-test, jiġifieri

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ teħid bil} - \text{kimika tat} - \text{test} - \text{mg } O_2 \text{ teħid bl} - \text{imbjank})}{(\text{mg kimika tat} - \text{test fil} - \text{garafina})}$$

mg O_2 per mg tal-kimika tat-test

▼B

Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni huwa imbagħad akkwistat minn:

$$\%\ \text{biodegradazzjoni} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kimika)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg kimika)}} \times 100\ \%$$

Għat-taħlitiet, ikkalkola il-ThOD mill-analiżi elementali, bħal fil-każ ta' kompost sempliċi. Uża il-ThOD ($ThOD_{NH4}$ jew $ThOD_{NO3}$) xierqa skond ta' jekk in-nitrifikazzjoni tkunx assenti jew kompluta (l-Anness II.2). Jekk b'danakollu, n-nitrifikazzjoni isseħħ imma ma tkunx kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

Ikkalkola l-persentaġġ tal-biodegredazzjoni primarja mit-telf ta' kimika speċifika (paterna) (ara I.7,2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Jekk issib li kien hemm xi telf tal-kimika tat-test fil-garafina nru. 1, kejjel it-tneħħija fiżiku-kimika, agħmel rapport dwar dan u uża l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test (S_b) wara 28 jum f din il-garafina sabiex tikkalkola l-persentaġġ tal-biodegredazzjoni.

Meta jsiru d-determinazzjonijiet ta' DOC (voluntarji), ikkalkola il-persentaġġ aħħari tal-biodegredazzjoni, minn:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

kif deskritt taħt il-punt I.7.1. Jekk issib li kien hemm xi telf tal-DOC fil-garafina nru. 1, kejjel it-tneħħija fiżiku-kimika, uża l-konċentrazzjoni DOC fdin il-garafina sabiex tikkalkola l-persentaġġ tal-biodegredazzjoni.

Irreġistra r-riżultati kollha dwara id-data fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

VII.3.2. **Validità tar-riżultati**

It-teħid ta' l-ossiġenu ta' l-inoculum fl-imbjank normalment huwa 20-30 mg O_2/litru u m'għandux ikun aktar minn 60 mg/litru fi 28 jum. Valuri għola minn 60 mg/litru jkunu jeħtieġu eżaminazzjoni kritika tad-data u tat-tekniki sperimentali. Jekk il-valur tal-pH huwa 'l barra mill-medda 6-8,5 u l-konsum ta' l-ossiġenu bil-kimika tat-test huwa anqas minn 60 %, it-test għandu jkun repetut b'konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test.

Ara wkoll I.5.2.

Jekk il-presentaġġ tad-degradazzjoni ta' l-anilin ikkalkolat mill-konsum ta' l-ossiġenu ma jkunx jeċċedi 40 % wara 7 tijiet u 65 % wara 14-il jum, it-test ikun meqjus bħala invalidu.

VII.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

VII.4. FOLJATAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti hawn taħt.

TEST MITI (1)

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

▼B

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/l bħala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, C_o: mg/l bħala kimika

Volum tat-taħlita ta' reazzjoni, V: ml

ThOD: mg O_2/l

4. **INOCULUM**

Siti tal-kampjunar tal-ħama':

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Konċentrazzjonijiet ta' solidi sospiżi fil-ħama' attivata wara l-akklamitizzazzjoni bid-drenaġġ sintetiku +… mg/litru

Volum tal-ħama' attivata kull litru tal-medja finali =… ml

Konċentrazzjoni tal-ħama' fil-medja finali =… mg/litru

5. **TEĦID TA' L-OSSIĠENU BIODEGRADABBILITÀ**

Tip ta' respirometru użat:

			(jum)				
			0	7	14	21	28
O_2 upt. (mg), kimika tat-test	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 upt. (mg), imbjank	b						
Ikkorreġut O_2 upt. (mg)	(a_1 - b) (a_2 - b) (a_3 - b)						
BOD kull mg tal-kimika tat-test	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Garafina 1.					
		Garafina 2.					
		Garafina 3.					
% degradazzjoni $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		medja (*)					

(*) bħala kondizzjoni stabbli(medja).

▼B

Nota: Formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kompost ta' referenza.

6. **ANALIŻI TAL-KARBONJU** (voluntarju)**:**

Analizzatur tal-karbonju:

Garafina	DOC				% DOC imneħħi	Medja
	Imkejjel		Ikkorreġut			
Ilma + sustanza tat-test	a				—	—
Ilma + sustanza tat-test	b_1		b1 – c			
Ilma + sustanza tat-test	b_2		b_2 – c			
Ilma + sustanza tat-test	b_3		b_3 – c			
Kontroll fl-imbjank	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC imneħħi} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA SPECIFIKA KUMIKA ANALITIKA**

	Ammont residwu tal-kimika tat-test fit-tmiem tat-test	% degradazzjoni
Test imbjank bl-ilma	S_b	
meda inokulata	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ degradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Ikkalkola il- % tad-degradazzjoni għall-garafini a1, a2 u a3 rispettivament

8. **RIMARKI**

Il-kurva BOD kontra l-ħin, jekk disponibbli, għandha tkun mehmuża.

▼B

ANNESS I

ABBREVJAZZJONIJIET U DEFINIZZJONIJIET

DO: Ossiġenu mdewweb (mg/l) hija l-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mdewweb f'kampjun akweju.

BOD: Talba biokimika ta' l-ossiġenu (g) hija l-ammont ta' l-ossiġenu ikkunsmat mill-mikro-organiżmi meta ssir il-metabolizzazzjoni tal-kompost tat-test; espress wkoll bħala g teħid ta' l-ossiġenu kull g tal-kompost tat-test. (ara l-metodu C.5).

COD: Talba ta' l-ossiġenu Kimiku (g) hija l-ammont ta' orriġenu ikkunsmat matul l-assidizzazzjoni ta' kompost tat-test bl-aċidu dikromatiku jaħraq; din tipprovdi għall-ammont tal-materja ossidizzabbli preżenti; ukoll espressa bħala g ossiġenu ikkunsmat kull g tal-kompost tat-test. (ara l-metodu C.6).

DOC: Karbonju organiku mdewweb huwa l-karbonju organiku preżenti fit-taħlita jew li jgħaddi minn filtru ta' 0,45 mikrometri jew jibqa fis-supernatant wara ċ-ċentrifigazzjoni fi 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) għal 15-il minuta.

ThOD: Talba teoretika ta' l-ossiġenu (mg) hija l-ammont totali ta' l-ossiġenu meħtieġ għall-ossidizzazzjoni kompleta ta'kimika; hija ikkalkolata mill-formula molekulati (ara l-Anness II.2) u hija wkoll espress bħala mg ossiġenu meħtieġ kull mg tal-kompost tat-test.

$ThCO_2$: Diossidu karbonju teoretiku (mg) hija l-kwantita ta' diossidu tal-karbonju ikkalkolat li jkun prodott mill-kontenut tal-karbonju magħruf jew imkejjel tal-kompost tat-test meta kompletament mineralizzat, ukoll espress bħala mg diossidu tal-karbonju kull mg tal-kompost tat-test.

TOC: Karbonju organiku totali ta' kampjun huwa s-somma tal-karbonju organiku fit-taħlita u fissospenzjoni.

IC: Karbonju inorganiku

TC: Karbonju totali huwa s-somma tal-karbonju organiku u inorganiku preżenti f'kampjun.

Biodegredazzjoni primarja:

hija t-tibdil fl-istruttura kimika ta' sustanza, imwassla bl-azzjoni bjoloġika, li tirriżulta mit-telf ta' proprjetà speċifika ta' dik is-sustanza.

Biodegredazzjoni finalissima (erobika):

hija l-livell tad-degradazzjoni akkwistata meta l-kompost tat-test ikun totalment utilizzat bil-mokroorganiżmi li jirriżulta fil-produzzjoni tad-diossidu tal-karbonju, ilma, melħ minerali u kostitwenti ġodda mikrobjali ċellulari (biomassa).

Biodegrabbillità Pronta:

klassifikazzjoni arbitrarja tal-kimika li tkun għaddiet minn ċerti testijiet speċifiċi tal-għażla għall-biodegradabbilità finalissima; dawn it-testijiet huma hekk strinġenti li huma assumiti li tali komposti jkunu malajr jew kompletament biodegradabbli f'ambjenti akweji permezz ta' kondizzjonijiet erobiċi.

▼B

Biodegrabbillità Inerenti:

klassifikazzjoni tal-kimika li dwarha jkun hemm evidenza mingħajr ekwivoku tal-biodegradazzjoni (primarja jew finalissima) fi kwalunkwe test rikonoxxut tal-biodegradabbilità.

Trattabbilità:

hija l-amenabbilità ta' komposti għat-tneħħija matul it-trattament bioloġiku ta' l-ilma ta' l-iskart mingħajr ma tkun affettwata b'mod ħażin l-operazzjoni normali tal-proċessi tat-trattament. Ġeneralment, komposti faċilment biodegradabbli jistgħu jkunu trattati, imma mhux il-komposti ineretament biodegradabbli huma hekk. Proċessi abjotiċi jistgħu ukoll ikunu operabbli.

L-ispazju

taż-żmien mill-innokulazzjoni, fit-test tat-tneħħija bil-kulur, sal-persentaġġ tad-degradazzjoni, jkun żdied b'mill anqas 10 %. L-ispazju taż-żmien huwa ta' spiss varjabbli u riproduċibbli ħażin ħafna.

Il-ħin tad-degradazzjoni

huwa l-ħin mit-tmiem ta' l-ispazju tal-ħin sal-ħin li 90 % tal-livell massimu tad-degradazzjoni tkun ġiet milħuqha.

Il-perijodu ta' 10 ijiem

huma l-10 jiem li immedjetament isegwu l-akkwist ta' l-10 % degradazzjoni.

▼B

ANNESS II

KALKOLU U DETERMINAZZJONI TA' PARAMETRI SOMMARJI XIERQA

Jiddependi mill-metodu magħżul, ċerti parametri sommarji jkunu meħtieġa. Is-sezzjoni li ġejja tiddeskrivi dderiva ta' dawn il-valuri. L-użu ta' dawn il-parametri hija deskritta fil-metodi individwali.

1. **Kontenut tal-Karbonju**

Il-kontenut tal-karbonju huwa ikkalkolat minn komposizzjoni elementali magħrufa jew determinata bl-analiżi elementali tas-sustanza tat-test.

2. **ThOD = Theoretical Oxygen Demand (Talba teoretika ta' l-ossiġenu)**

It-Talba teoretika ta' l-ossiġenu (ThOD) tista tkun ikkalkolata jekk il-komposizzjoni elementali tkun magħrufa jew determinata b'analiżi elementali. Hija għal kompost:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

mingħajr nitrifikazzjoni,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

jew bin-nitrifikazzjoni,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\,[2\,c + 1/2\,(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Talba ta' l-Ossiġenu Kimiku (COD)**

It-Talba ta' l-Ossiġenu Kimiku (COD) hija determinata skond il-metodu C.6.

4. **DOC = Dissolved Organic Carbon (Karbonju organiku mdewweb)**

Il-Karbonju organiku mdewweb (DOC) huwa bid-definizzjoni l-karbonju organiku ta' kwalunkwe kimika jew taħlita fl-ilma li tgħaddi minn filtru 0,45 mikrometri.

Kampjuni mir-reċipjenti tat-test huma miġbura u iffiltrati immedjatament minn apparat tal-filtrazzjoni bluż ta' membrana filtranti xierqa. L-ewwel 20 ml (l-ammont jista jkun imnaqqas meta jsir użu minn filtranti żgħar) tal-filtrat ikunu mwarrba. Volumi ta' 10-20 ml jew anqas, jekk injettati (il-volum jiddependi mill-ammont meħtieġ għall-analizzatur tal-karbonju) huma miżmuma għall-analizzar tal-karbonju. Il-konċentrazzjoni DOC hija determinata permezz ta' l-analizzatur tal-karbonju organiku li huwa kapaċi li jkejjel b'eżatezza l-konċentrazzjoni tal-karbonju ekwivalenti għal, jew aktar baxxa minn 10 % tal-konċentrazzjoni DOC inizjali użat fittest.

Kampjuni iffiltrati li ma jkunux jistgħu jiġu analizzati fl-istess jum utili jistgħu ikunu preservati bil-ħażna fir-refriġeratur fi 2-4 °C għal 48 h, jew f'anqas minn 18 °C għal perijodu twil.

Rimarki:

Filtri tal-membra huma ta' spiss impregnati b'surfaktanti għall-idrofilizzazzjoni. B'hekk il-filtru jista jkun fih sa diversi mg ta' karbonju organiku solubbli li jkun jinterferixxi fid-determinazzjonijiet tal-biodegradabbilità. Surfaktanti u komposti organiċi solubbli oħrajn huma mneħħija mill-filtri billi jkunu mogħllija f'ilma dejonizzat għal tlett perijodi ta' siegħa kull wieħed. Il-filtri jistgħu mbagħad ikunu maħżuna fl-ilma għal ġimgħa waħda. Jekk ikunu wżati l-kartuċċi tal-filtri, kull lott għandu jkun ivverifikat dwar il-konformità li dan ma jkunx jirrilaxxa karbonju organiku li jinħall.

▼B

Jiddependi mit-tip tal-filtri tal-membrana, l-kimika tat-test tista' tkun miżmuma bl-assorbazzjoni. Jista jkungħalhekk rakkomandabbli li jkun assigurat li l-kimika tat-test ma tkunx miżmuma bil-filtru.

Centrifugazzjoni fi 40 000 m.sek 2 (4 000 g) għal 15-il minuta tista tkun użata għad-differenzazzjoni ta' TOC versus DOC minflok il-filtrazzjoni. Il-metodu mhux affidabbli fil-konċentrazzjoni inizjali ta' < 10 mg DOC/-l ladarba jew mhux il-bakterja kollha tkun imneħħija jew inkella l-karbonju bħala parti tal-bakterja, plażma tkun imdewba mill-ġdid.

BIBLJOGRAFIJA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat.Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs-und StoffkenngroLen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoff-bedarfs (CSB) (H 41), Normenausschu1 Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1),169.

▼B

ANNESS III

EVALWAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ TA' SUSTANZI LI FTIT LI XEJN JINĦALLU

Fit-testijiet tal-biodegradabbilità b'sustanzi li ftit li xejn jinħallu, l-aspetti li ġejjin għandhom jirċievu attenzjoni speċjali.

Waqt li l-likwidi omoġenji rari jippreżentaw problemi tal-kampjunar, huwa rakommandabbli li materjali solidi jkunu omoġenizzati bil-mezzi xierqa sabiex ikunu evitati żbalji minħabba n-nuqqa ta' omoġenità.

Attenzjoni speċjali għandha tkun mogħtija meta kampjuni rappreżentattivi ta' ftit milligrammi huma meħtieġa minn taħlitiet ta' kimika jew sustanzi b'ammonti żgħar ta' impuritajiet. Diversi għamliet ta' aġitazzjoni matul it-testijiet tista tkun użata. Attanzjoni għandha tingħata għall-użu biss ta' aġitazzjoni suffiċjenti sabiex il-kimika tinżamm imxerda, u sabiex ikunu evitati sħana żejda, rgħawwa eċċessiva u forzi qawwija eċċessivi.

Jista jkun użat emulsifikatur li jagħti tixrid stabbli tal-kimika. Dan m'għandux ikun tossiku għall-bakterja u m'għandux ikun biodegradabbli jew li joħloq ir-rgħawwa bil-kondizzjonijiet tat-test.

L-istess kriterja hija applikabbli għal solventi bħalma hija applikabbli għall-emulsifikanti.

Mhux rakkomandat li trasportaturi solidi jkunu wżati għal sustanzi solidi tat-test imma dawn jistgħu ikunu adatti għal sustanzi żejtnija.

Meta sustanzi awżiljarji bħalma huma l-emulsifikanti, solventi u trasportaturi jkunu wżati, prova fl-imbjank li jkun fiha s-sustanza awżiljarja, għandha tkun imwettqa.

Kwalunkwe mit-tlett testijiet respirometriċi $C0_2$, BOD, MITI jistgħu ikunu wżati fl-istudju tal-biodebradabbilità tal-komposti li ftit li xejn jinħallu.

BIBLJOGRAFIJA

— de Morsier, A. et al., *Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere,* 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P., *The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere*, 1984, vol. 13, 169.

▼B

ANNESS IV

EVALWAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ TA' KIMIKA SUSPETTATA LI TKUN TOSSIKA GĦALL-INOCULUM

Meta kimika hija suġġetta għal testijiet ta' biodegradabbilità faċli u tidher li ma tkunx biodegradabbli, l-proċedura li ġejja hija rakommandabbli jew distinzjoni bejn l-inibizzjoni u l-inenità tkun mixtieqa (Reynolds et al., 1987).

Inocula simili jew identika għandha tkun użata għat-testijiet tat-tossiċità u l-biodegredazzjoni.

Sabiex tkun assessjata t-tossiċità tal-kimika studjata f'testijiet tal-biodegradibbiltà faċli, l-applikazzjoni ta' ġemgħa waħda ta' l-inibizzjoni tar-rata tar-Respirazzjoni tal-Ħama' (test ta' l-inibizzjoni tar-respirazzjoni talḥama attivata – Dir 88/302/EEC), BOD u/jew il-metodi ta' l-Inibizzjoni tat-Tkabbir, għandhom ikunu jidħru jidhru xierqa.

Jekk l-inibizzjoni minħabba t-tossiċità għandha tkun evitata, huwa suġġerit li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test użata fit-testijiet tal-biodegradabbiltà faċli għandha tkun mhux anqas minn 1/10 tal-valuri EC_{50} (jew anqas mill-valuri EC_{20}) akkwistati fit-testijiet tat-tossiċità. Komposti b'valur EC_{50} jew akbar minn 300 mg/l aktarx li ma jkollhomx effetti tossiċi fit-testijiet tal-biodehradabbiltà faċli.

Il-valuri EC_{50} ta;' anqas minn 20 mg/l huma aktarx li jimponu problemi serji għal testijiet sussegwenti. Konċentrazzjoni tat-test baxxi għandhom ikunu użati, li joħolqu l-ħtiega ta' l-użu tat-test strinġenti u sensittiv tal-Flixkun Magħluq jew l-użu ta' 14C – materjal bit-tikketta. B'mod alternattiv, *inoculum* akklamitizzat jista jippermetti li jkunu użati konċentrazzjonijiet ogħla tas-sustanza tat-test. F'dan il-każ ta' l-aħħar, b'danakollu, l-kriterja speċifika tat-test tal-biodegradabbilità faċli li tintilef.

BIBLJOGRAFIJA

Reynolds, L. et al., *Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability*. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

ANNESS V

KORREZZJONI TAT-TEĦID TA' L-OSSIĠENU GĦALL-INTERFERENZA BIN-NITRIFIKAZZJONI

Żbalji minħabba li ma tkunx ikkonsidrata n-nitrifikazzjoni fil-kalkolazzjoni tat-teħid ta' l-ossiġenu bilbiodegradabbilità tas-sustanzi tat-test li ma jkun fihom N huma marġinali (mhux akbar minn 5 %), anki jekk l-ossidazzjoni ta' l-ammonju-N fil-medja isseħħ b'mod erratiku bħal bejn ir-reċipjenti tat-test u l-imbjank. B'danakollu, għal sustanzi tat-test li jkun fihom N, żbalji serji jistgħu iseħħu.

Jekk in-nitrifikazzjoni tkun seħħet imma ma tkunx kompluta, t-teħid osservat ta' l-ossiġenu bit-taħlita tarreazzjoni jista' jkun ikkoerruġut għall-ammont ta' l-ossiġenu użat fl-ammonju ossidizzanti għan-nitrit u nnitrat, jekk il-bidliet fil-konċentrazzjoni matul l-inkubazzjoni tan-nitrit u n-nitrat huma determinati bilkonsiderazzjoni ta' dawn l-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_2 + 2\ HCI + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Globalment:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Mill-ekwazzjoni (1), l-akkwist ta' l-ossiġenu bit-28 g ta' nitroġenu li jkun jinsab fil-klorid ta' l-ammonium (BH_4C1) li jkun ossidizzat għan-nitrit huwa 96 g, i.e. fattur ta' 3,43 (96/28). Bl-istess mod, mill-ekwazzjoni (3), l-akkwist ta' l-ossiġenu bit-28 g ta' nitroġenu li jkun ossidizzat għan-nitrit huwa 128 g, i.e. fattur ta' 4,57 (128/28).

Ladarba r-reazzjonijiet huma sekwenzali, li jkunu esegwiti minn speċje ta' bakterja distinta u differenti, huwa possibbli għall-konċentrazzjoni tan-nitrit li tiżdied jew tonqos; f'dan il-każ ta' laħħar, konċentrazzjoni ekwivalenti tan-nitrat ikun iffurmat. Għalhekk, l-ossiġenu ikkunsmat fil-formazzjoni ta' ornitrat hija 4,75 multiplikata biż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat, filwaqt li l-ossiġenu assoċjaat mal-formazzjoni tan-nitri hija 3,43 multiplikata biż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrit jew bit-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tagħha, ittelf ta' l-ossiġenu huwa - 3,43 moltiplikat bit-tnaqqis fil-konċentrazzjoni.

Dan ifisser:

0_2 ikkunsmat fil-formazzjoni tan-nitrat = 4,57 × iż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat (4)

u

0_2 ikkunsmat fil-formazzjoni tan-nitrit = 3,43 × iż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrit (5)

u

0_2 mitluf fl-għebien tan-nitrit = - 3,43 × it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tan-nitrat (6)

Sabiex

0_2 akkwistat minħabba n-nitrifikazzjoni = ± 3,43 × il-kambjament fin-nitrit ikkonċentrat + 4,57 ×i żida fin-nitrat ikkonċentrat. (7)

u għalhekk

0_2 akkwistat minħabba l-ossidizzazzjoni C = l-akkwist totali osservat – l-akkwist minħabba nnitrifikazzjoni (8)

B'mod alternattiv, jekk it-total biss ta' l-N ossidizzat huwa determinat, l-akkwista ta' l-ossiġenu minħabba nnitrifikazzjonijista' jkun meqjus bħala, fl-ewwel approssimazzjoni, 4,57 × iż-żieda fl-N ossidizzat.

Il-valur ikkorreġut għall-konsum ta' l-ossiġenu minħabba l-ossidizzazzjoni ta' C huwa mbagħad imqabbel mal- ThOD NH_3, kif ikkalkolat fl-Anness II.

▼B

C.5 **DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU BIOKEMIKALI**

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop tal-metodu huwa l-kejl tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali (BOD) ta' sustanzi organiċi solidi u likwidi.

L-informazzjoni elaborata b'dan it-test tappartjeni għal komposti li jinħallu fl-ilmal b'dana kollu, komposti volatili u dawk b'solubbiltà baxxa fl-ilma jistgħu wkoll, għall-anqas fil-prinċipju, jkunu ittestjati.

Il-metodu huwa applikabbli biss għal dawk il-materja organiċi tat-test li ma humiex inibitorji għall-bakterja fil-konċentrazzjoni użata fit-test. Jekk il-materjal tat-test ma jkunx jinħall fil-konċentrazzjoni tat-test, miżuri speċjali, bħalma hu l-użu ta' dispersjoni ultrasonika, jistgħu jkunu wżati sabiex tkun akkwistata dispersjoni tajba tal-materjal tat-test.

Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika tista tkun utili għall-interpretazzjoni ta' riżultati baxxi u fil-għażla tal-konċentrazzjonijiet xierqa tat-test.

1.2. DEFINIZZJONI U UNITAJIET

Il-BOD huwa definit bħala l-massa ta' ossiġenu mdewweb meħtieġ minn volum speċifikat tat-taħlita tas-sustanza għall-proċess ta' l-ossidizzazzjoni biokimika skond il-kondizzjonijiet preskritti.

Dawn ir-riżultati huma espressi bħala grammi tal-BOD f'kull gramma tas-sustanza ittestjata.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

L-użu ta' sustanza ta' referenza xierqa għall-verifika ta' l-attività ta' l-inoculum hija mixtieqa.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Ammont predominanti tas-sustanza, mdewweb jew imxerred b'medja adatta sew-arjata, huwa innokulat mal-mikro-organiżmi u inkubat f'temperatura kostanti ambjenti definita, f'post fid-dlam.

Il-BOD huwa determinat bid-differenza tal-kontenut ta' l-ossiġenu mdewweb fil-bidu u fit-tmien tat-test. It-tul ta' żmien tat-test għandu jkun mill-anqas ħamest ijiem u mhux aktaar minn 28 jum.

Imbjank għandu jkun determinat f'assaġġ parallel li ma jkun fih l-ebda sustanza tat-test.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Id-determinazzjoni BOD ma tistgħax tkun meqjusa bħala determinazzjoni valida tal-biodegradabbiltà ta' sustanza. Dan it-test jista biss ikun meqjus bħala test ta' prova.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Taħlita jew tixrid preliminari tas-sustanza huwa ippreparat sabiex tkun akkwista l-konċentrazzjoni BOD kompatibbli mal-metodu użat. Il-BOD huwa mbagħad determinat skond kwalunkwe metodu standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

▼B

2. **DATA U EVALWAZZJONI**

Il-BOD li jkun jinsab fit-taħlita preliminari huwa kalkolat skond il-metodu normalizzat magħżul, u konvertit fi grammi ta' BOD kull gramma tas-sustanza tat-test.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Il-metodu użat għandu jkun mistqarr.

It-talba għall-ossiġenu biokemikali għandha tkun il-medja ta' mill-anqas tlett kejl validi.

L-informazzjoni u r-rimarki kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu irrappurtati, speċjalment f'dak li jirrigwardja l-impuritajiet, l-istat fiżiku, l-effetti tossiċi u l-komposizzjoni inerenti tas-sustanza.li jkunu jaffettwaw ir-riżultati.

L-użu ta' addittiv għall-inibizzjoni tan-nitrifikazzjoni bioloġika għandu jkun irrappurtat.

4. REFERENZI

Lista ta' metodi standardizzati, per eżempju:

NF T 90-103: Determinazzjoni tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali.

NBN 407: Talba ta' l-ossiġenu biokemikali.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

Id-determinazzjoni tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali, il-Metodu S għall-eżaminazzjoni ta' l-ilma u l-materjali assoċjati, HMSO, Londra.

ISO 5815: Determinazzjoni tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali wara n jiem.

▼B

C.6. DEGRADAZZJONI — TALBA TA' L-OSSIĠENU KEMIKALI

1. METODU

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop tal-metodu huwa l-kejl tat-talba ta' l-ossiġenu kemikali (COD) ta' sustanzi organiċi solidi u likwidi f'manjera normali, arbitrarja, skond kondizzjonijiet fissi tal-laboratorju.

Informazzjoni dwar il-formula tas-sustanza tkun utili għat-twettieq tat-test u l-interpretazzjoni tar-riżultat akkwistat (eż. imluħa aloġenizzati, imluħa ferrużi ta' komposti organiċi, komposti organoklorini).

1.2. DEFINIZZJONIJIET U U NITAJIET

It-talba ta' l-ossiġenu kemikali hija l-kejl ta' l-ossidabbilità ta' sustanza, espressa fl-ammont ekwivalenti ta' ossiġenu ta' reaġent ossidizzanti ikkunsmat mis-sustanza skond kondizzjonijiet fiss-tal-laboratorju.

Ir-riżultat huwa espress bħala grammi tal-COD kull gramma tas-sustanza ittestjata.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza ma jeħtieġux li jkunu wżati fil-każi kollha meta tkun investigata sustanza ġdida. Dawn għandhom primarjament iservu għall-kalibrazzjoni tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu l-paragun mar-riżultati tal-metodu applikat.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Ammont predeterminat tas-sustanza, imdewba jew imxerda fl-ilma, huwa ossidizzat bid-dikromat tal-putass f'medja qawwija ta' l-aċidu sulfuriku bis-sulfat tal-fidda bħala katalist, taħt reflus għal sagħtejn. Id-dikromat residwu huwa determinat bit-titrazzjoni mas-sulfat ta' l-ammonium ferruż standardizzat.

Fil-każ ta' sustanzi li jkun fihom il-klorin ([1]), sulfat tal-merkurju huwa miżjud sabiex titnaqqas l-interferenza tal-klorid.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Minħabba l-manjiera arbitrarja tad-determinazzjoni, il-COD huwa "indikatur ossidizzabbli" u bhala tali użat bħala metodu prattiku fil-kejl tal-materja organika.

Il-klorid jista jinterferixxi f'dan it-test, aġenti inorganiċi tat-tnaqqis jew ta' l-ossidizzazzjoni jistgħu ukoll jinterferixxu mad-determinazzjoni tal-COD.

Uħud mill-kompost ċikliċi u ħafna mis-sustanzi volaiti (eż. aċidi xaħmija baxxi) ma humiex kompletament ossidizzati b'dan it-test.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Taħlita jew tixrid preliminarji tas-sustanza huma ippreparati sabiex ikun akkwistat COD bejn 250 u 600 mg kull litru.

([1]) Wara l-użu, is-soluzzjonijiet li fihom *salts* tal-merkurju għandhom jiġu trattati sabiex jiġi evitat it-tixrid tal- merkurju fl-ambjent.Altrimentri l-BOD huwa mbagħad determinat skond kwalunkwe metodu xieraq standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

▼B

Rimarki:

Fil-każ ta' sustanza li ma tantx tinħall u mhux-dispersibbli, ammont ta' sustanza miġjuba trab fin jew sustanza likwida korrespondenti għal madwar S mg ta' COD tista tkun miżuna u poġġuta fl-apparat esperimentali bl-ilma.

It-talba ta' l-ossiġeni kemikali (COD) hija ta' spiss u speċjalment fil-każ ta' sustanzi li ma tantx jinħallu, determinata b'mod vantaġġuż ġewwa varjant tal-metodu, i.e., f'sistema magħluqa bl-ekwalizzatur tal-pressjoni (H. Kelkenberg, 1975). F'din il-modifika, l-komposti huma determinati biss b'diffikulta bil-metodu konvenzjonali. – eż. aċidu aċetiku – jista ta' spiss ikun kwantifikat b'suċċess. Il-metodu wkoll jonqos, b'dana kollu, fil-każ tal-pridin Jekk il-konċentrazzjoni tad-dikromat tal-putassa, kif preskritt fir-ref. (1), huma mtella għal 0,25 N (0,0416 M), l-użin dirett ta' 5-10 mg tas-sustanza huwa faċilitat, li huwa essenzali għad-determinazzjoni tal-COD ta' sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma (ref. (2)).

Altrimenti l-BOD huwa mbagħad determinat skond kwalunkwe metodu xieraq standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

2. **DATA U EVALWAZZJONI**

Il-COD li jkun jinsab fil-garafina sperimentali huwa ikkalkolat skond il-metodu normalizzat magħżul, u ikkonvertit fi grammi ta' COD kull gramma tas-sustanza tat-test.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Il-metodu użat għandu jkun mistqarr.

It-talba għall-ossiġenu kemikali għandha tkun il-medja ta' mill-anqas tlett kejl validi. L-informazzjoni u r-rimarki kollha relevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu irrappurtati, speċjalment f'dak li jirrigwardja l-impuritajiet, l-istat fiżiku, l-effetti tossiċi u l-komposizzjoni inerenti tas-sustanza.li jkunu jaffetwaw ir-riżultati.

L-użu tas-sulfat tal-merkurju għal minimizzar ta' l-interferenza tal-klorid għandu jkun rapportat.

4. **REFERENZI**

(1) Kelkenberg, H.,Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Lista ta' metodi standardizzati, per eżempju:

NBN T 91-201 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossiġnu.

ISBN 0 11 7512494 Id-domanda kemikali ta' l-ossiġnu (il-valur tad-*dichromate*) ta' l-ilmijiet imniġġsa u *waste waters.*

NFT 90-101 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossiġnu.

DS 217 = L-analiżi ta' l-ilma Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossiġnu.

DIN 38409-H-41 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossiġnu (COD) fil-medda li tasal iktar minn 15 mg kull litru.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Kwalità ta' l-ilma: talba ta' l-ossiġenu kemikali metodi dikromati.

▼B

C.7. ID-DEGRADAZZJONI – ID-DEGRADAZZJONI ANTIBIJOTIKA: L-IDROLISI BĦALA FUNZJONI TAL-PH

1. METODU

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalenti għall-OECD TG 111 (2004).

1.1. DAĦLA

Il-kimiċi jistgħu jidħlu fl-ilmijiet tal-wiċċ b'tali metodi bħall-applikazzjoni diretta, l-irxiex, l-ilma li jiskula, id-drenaġġ, ir-rimi ta' l-iskart, l-effluwent industrijali, domestiku jew agrikolu u d-depożizzjoni atmosferika u jistgħu jiġu ttrasformati f'dawk l-ilmijiet minn proċessi kimiċi (eż. l-idrolisi, l-ossidazzjoni), fotokimiċi u/jew mikrobjali. Din il-Linja Gwida tiddeskrivi metodu tat-test fil-laboratorju biex jiġu stmati trasformazzjonijiet idrolitiċi abjotiċi tal-kimiċi f'sistemi akkwatiċi ta' valuri pH normalment misjuba fl-ambjent (pH 4 – 9) u hija bbażati fuq Linji Gwidi eżistenti (1)(2)-(3)(4)(5)(6)(7).

L-esperimenti huma mwettqa sabiex jiġu ddeterminati (i) ir-rata ta' l-idrolisi tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-pH u (ii) l-identità jew in-natura u r-rati tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti ta' l-idrolisi li għalihom jistgħu jiġu esposti l-organiżmi. Dawn l-istudji jistgħu jkunu meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati għall-ilma jew li x'aktarx jilħqu l-ambjent b'mezzi oħrajn deskritti hawn fuq.

1.2. DEFINIZJONIJIET U UNITAJIET

Ara l-Anness 2

1.3. L-APPLIKABILITÀ TAL-METODU

Il-metodu ġeneralment jgħodd għal sustanzi kimiċi (mingħajr tikketta jew bit-tikketta) li għalihom huwa disponibbli metodu analitiku bi preċiżjoni u sensittività biżżejjed. Jgħodd għall-komposti ftit volatili u mhux volatili ta' solubbiltà suffiċjenti fl-ilma. It-test ma għandux jgħodd għall-kimiċi li huma volatili ħafna mill-ilma (eż. fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistax jinżamm fit-taħlita taħt il-kondizzjonijiet esperimentali ta' dan it-test. It-test jista' jkun diffiċli li jitwettaq b'sustanzi ta' solubbiltà minima fl-ilma (8).

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Taħlitiet *buffer* solubbli bl-ilma ta' valuri pH differenti (pH 4, 7 u 9) huma trattati bis-sustanza tat-test u inkubati fid-dlam taħt kondizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati (b'temperaturi kostanti). Wara intervalli xierqa ta' żmien, it-taħlitiet *buffer* huma analizzati għas-sustanza tat-test u għall-prodotti ta' l-idrolisi. Bis-sustanza tat-test ittikkettjat (eż. ^{14}C), jista' jiġi stabbilit bilanċ tal-massa b'mod aktar faċli.

Dan il-metodu tat-test huwa diżinjat bħala strateġija f'saffi li tintwera u hija spjegata fl-Anness 1, Kull saff huwa mibdi mir-riżultati tas-saff ta' qablu.

▼B

1.5. L-INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Is-sustanza tat-test mingħajr tikketta jew bit-tikketta tista' tintuża biex titkejjel ir-rata ta' l-idrolisi. Il-materjal ittikkettjat ġeneralment huwa preferut għall-istudju tar-rotta ta' l-idrolisi u biex jitwaqqaf il-bilanċ tal-massa; iżda, f'każijiet speċjali, l-ittikkettjar jista' ma jkunx assolutament neċessarju. L-ittikkettjar ta' ^{14}C huwa rrakkomandat iżda l-użu ta' iżotopi oħrajn bħal ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, jista' jkun utli wkoll. Sa fejn possibbli, it-tikketta għandha tkun pożizzjonata fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekula. Per eżempju, jekk is-sustanza tat-test fiha ċirku wieħed, it-tikkettjar fuq dan iċ-ċirku huwa meħtieġ; jekk is-sustanza tat-test fiha żewġ ċrieki jew aktar, jistgħu jkunu meħtieġa studji separati biex jiġi evalwat id-destin ta' kull ċirku ttikkettjat u biex jinkiseb l-informazzjoni xierqa dwar il-formazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi. Is-safa tas-sustanza tat-test għandha tkun mhux inqas minn 95 %.

Qabel ma jsir it-test ta' l-idrolisi, għandha tkun disponibbli din l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test:

a) is-solubbiltà fl-ilma [Il-Metodu tat-Test A.6];

b) is-solubbiltà fis-solventi organiċi;

ċ) il-pressa tal-fwar [Metodu tat-Test A.4] u/jew il-kostant tal-Liġi ta' Henry;

d) il-koeffiċjenti tal-qsim n-octanol/ilma [Il-Metodu tat-Test A.8];

e) il-kostant tad-dissoċjazzjoni (pK_a) [Linja Gwida 112 ta' l-OECD] (9);

f) rata ta' fototrasformazzjoni diretta u indiretta fl-ilma fejn xieraq.

Il-metodi analitiċi għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza tat-test u, jekk huwa rilevanti, għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi f'taħlitiet bl-ilma għandhom ikunu disponibbli (ara wkoll it-taqsima 1.7.2).

1.6. IS-SUSTANZI TA' RIFERENZA

Fejn possibbli, is-sustanzi ta' riferenza għandhom jintużaw għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi bil-metodi spettroskopiċi u kromatografiċi jew metodi oħrajn sensittivi b'mod xieraq.

1.7. IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ

1.7.1. **L-irkupru**

L-analiżi ta', għall-inqas, soluzzjonijiet *buffer* doppji jew ta' l-estratti tagħhom immedjatament wara ż-żjieda tas-sustanza tat-test tagħti l-ewwel indikazzjoni tar-repetibbiltà tal-metodu analitiku u ta' l-uniformità tal-proċedura ta' l-applikazzjoni għas-sustanza tat-test. L-irkupru għal stadji aktar tard ta' l-esperimenti jingħata bil-bilanċi tal-massa rispettivi (meta jintuża materjal ittikkettjat). L-irkupru għandu jvarja minn 90 % sa 110 % għal kimiċi ttikkettjati u mhux ittikkettjati (7). Fil-każ li huwa teknikament diffiċli li tintlaħaq din l-iskala, irkupru ta' 70 % għall-kimiċi mhux ittikkettjati, iżda għandha tingħata ġustifikazzjoni.

▼B

1.7.2. **Ir-repetibbiltà u s-sensittività tal-metodu analitiku**

Ir-repetibbiltà tal-metodu/i analitiku/iċi biex tiġi kkwantifikata s-sustanza tat-test u l-prodotti ta' l-idrolisi f'ħinijiet aktar tard tista' tiġi vverifikata bl-analiżi doppja ta' l-istess taħlitiet *buffer* (jew ta' l-estratti tagħhom) wara li biżżejjed kwantitajiet ta' prodotti ta' l-idroliġi jkunu ffurmaw għall-kwantifikazzjoni.

Il-metodu analitiku għandu jkun sensittiv biżżejjed biex il-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test jiġu kkwalifikati sa 10 % jew inqas mill-konċentrazzjonijiet inizjali. Jekk huwa rilevanti, il-metodi analitiċi għandhom ukoll ikunu sensittivi biżżejjed biex jiġi kkwantifikat kwalunkwe prodott ta' l-idrolisi li jirrappreżenta 10 % jew aktar mill-applikat (fi kwalunkwe ħin matul l-istudju) sa 25 % jew inqas mill-konċentrazzjoni l-aktar għolja tagħha.

1.7.3. **L-intervalli ta' kunfidenza għad-data kinetika ta' l-idrolisi**

L-intervalli ta' kunfidenza għandhom jinħadmu u jiġu ppreżentati għall-koeffiċjenti kollha tar-rigressjoni, il-kostanti tar-rati, il-*half-lives*, u kwalunkwe parametri kinetiċi oħrajn (eż. DT50).

1.8. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.8.1. **It-tagħmir u l-apparat**

L-istudju għandu jsir f'kontenituri tal-ħġieġ (eż. tubi tat-testijiet, fliexken żgħar) taħt kundizzjonijiet mudlama u sterili, jekk meħtieġ, kemm-il darba l-informazzjoni preliminiari (bħall-koeffiċjenti tal-qsim ta' l-n-octanol-ilma) ma tindikax li s-sustanza tat-test tista' teħel mal-ħġieġ. F'dawn il-każijiet, jistgħu jkunu jridu jitqiesu materjali alternattivi (bħal Teflon). Jista' wkoll ikun possibbli li tittaffa l-problema ta' twaħħil mal-ħġieġ bl-użu ta' wieħed jew aktar minn dawn il-metodi:

— id-determinazzjoni tal-massa tas-sustanza tat-test u tal-prodotti ta' l-idrolisi sorbiti mal-kontenitur tat-test;

— l-użu ta' banju ultrasoniku;

— tiġi żgurata ħasla bis-solventi ta' l-oġġetti kollha tal-ħġieġ f'kull intervall tat-teħid tal-kampjuni;

— l-użu ta' prodotti formulati;

— l-użu ta' ammont akbar ta' kosolvent għaż-żjieda tas-sustanza tat-test mas-sistema; jekk jintuża kosolvent għandu jkun kosolvent li ma jidrolizzax is-sustanza tat-test.

Normalment huma meħtieġa oġġetti li jaġitaw il-banju ta' l-ilma u kkontrollati mit-temperatura jew inkubaturi kkontrollati termostatikament għall-inkubazzjoni tat-taħlitiet differenti tat-test.

Huwa meħtieġ tagħmir standard tal-laboratorju, inkluż b'mod partikolari, dawn li ġejjin

— miter tal-pH;

▼B

— strumenti analitiċi bħal tagħmir GC, HPLC, TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' l-iskoperta biex jiġu analizzati sustanzi radio-tikkettjati u mhux tikkettjati jew il-metodu tat-taħlit ta' l-iżotopi inversi;

— l-istrumenti għall-iskopijiet ta' l-identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);

— kalkulatur tal-fluworexxenza tal-likwidu;

— lembub li jisseparaw għall-estrazzjoni ta' likwidi-likwidi;

— strumentazzjoni biex jiġu kkonċentrati t-taħlitiet u l-estratti (eż. evaporator li jdur);

— tagħmir li jikkontrolla t-temperatura (eż. banju ta' l-ilma).

Ir-reaġenti kimiċi jinkludu, per eżempju:

— solventi organiċi, grad analitiku, bħal hexane, dichloromethane, eċċ.;

— likwidu tal-fluworexxenza;

— taħlitiet *buffer* (għad-dettalji ara t-taqsima 1.8.3).

L-oġġetti kollha tal-ħġieġ, l-ilma tal-grad ta' reaġent u t-taħlitiet *buffer* użati fit-testijiet ta' l-idrolisi għandhom jiġu sterilizzati.

1.8.2. **L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test**

Is-sustanza tat-test għandha tiġi applikata bħala taħlita ilmija fit-taħlitiet *buffer* differenti (ara l-Anness 3). Jekk huwa meħtieġ għat-taħlit xieraq, l-użu ta' ammonti żgħar ta' solventi li jitħalltu fl-ilma (bħall-acetonitrile, acetone, etanol) huwa permess għall-applikazzjoni u d-distribuzzjoni tas-sustanza tat-test iżda dan ma għandux normalment jeċċedi 1 % v/v. Fil-każ li titqies konċentrazzjoni oġħla ta' solventi (eż. fil-każ ta' sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu), dan jista' jkun permess biss meta jista' jintwera li s-solvent ma għandu ebda effett fuq l-idrolisi tas-sustanzi tat-test.

L-użu ta' prodott formulat mhuwiex rakkomandat bħala rutina, għaliex ma jistax jiġi eskluż li l-ingredjenti tal-formulazzjoni jistgħu jinfluwenzaw il-proċess ta' l-idrolisi. Madankollu, għas-sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu fl-ilma jew għal sustanzi li jeħlu mal-ħġieġ (ara t-taqsima 1.8.1), l-użu ta' materjal formulat jista' jkun alternattiv xieraq. Għandha tintuża konċentrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test;

ma għandhiex teċċedi 0,01 M jew nofs il-konċentrazzjoni tas-saturazzjoni (ara l-Anness 1).

▼B

1.8.3. **It-taħlitiet buffer**

It-test ta' l-idrolisi għandu jitwettaq f'valuri pH ta' 4, 7 u 9. Għal dan l-iskop, it-taħlitiet *buffer* għandhom jiġu ppreparati bl-użu ta' kimiċi tal-grad ta' reaġenti u ilma. Xi sistemi utli *buffer* huma ppreżentati fl-Anness 3. Għandu jiġi nnutat li s-sistema *buffer* użata tista' tinfluwenza r-rata ta' l-idrolisi u fejn dan huwa osservat għandha tintuża sistema alternata ta' *buffer* ([1]).

Il-pH ta' kull taħlita *buffer* għandu jiġi vverifikat b' pH meter ikkalibrat sa preċiżjoni sa għall-inqas 0,1 fit-temperatura meħtieġa.

1.8.4. **Il-kondizzjonijiet tat-test**

1.8.4.1. *It-temperatura tat-test*

L-esperimenti ta' l-idrolisi għandhom isiru f'temperaturi kostanti. Għall-iskopijiet ta' l-estrapolazzjoni, huwa importanti li tinżamm it-temperatura sa għall-inqas ± 0,5 °C.

Test preliminari (Livell 1) għandu jitwettaq f'temperatura ta' 50 °C jekk l-imġieba idrolitika tas-sustanza tat-test mhijiex magħrufa. It-testijiet kinetiċi ta' Livell Ogħla għandhom isiru f'mhux inqas minn tliet temperaturi (inkluż it-test ta' 50 °C) sakemm is-sustanza tat-test hija stabbli għall-idrolisi kif determinat mill-ittestjar tal-Livell 1. Skala suġġerita tat-temperatura hija 10-70 °C (preferibbilment f'għall-inqas temperatura waħda inqas minn 25 °C użat), li jinkludi t-temperatura tar-rapportar ta' 25 °C u l-parti l-kbira tat-temperaturi misjuba fil-qasam.

1.8.4.2. *Dawl u ossiġenu*

It-testijiet ta' l-idrolisi għandhom isiru bl-użu ta' kwalunkwe metodu xieraq biex jiġu evitati effetti fotolitiċi. Il-miżuri kollha xierqa għandhom jittieħdu biex jiġi evitat l-ossiġenu (eż. bit-tbaqbiq tal-helium, nitroġenu jew argon għal 5 minuti qabel il-preparazzjoni tat-taħlita).

1.8.4.3. *Kemm idum it-test*

It-test preliminari għandu jsir għal 5 ijiem fil-waqt li t-testijiet tal-Livell Ogħla għandhom isiru sad-90 % idrolisi tas-sustanza tat-test jew għal 30 jum, skond x'jiġi l-ewwel.

1.8.5. **It-twettiq tat-test**

1.8.5.1. *It-test preliminari (Livell 1)*

It-test preliminari jsir f'temperatura ta' 50 ± 0,5 °C u pH 4,0, 7,0 u 9,0. Jekk inqas minn 10 fil-mija ta' l-idrolisi jiġi osservat wara 5 ijiem ($t_{0,5}$ f'temperatura ta' 25 °C > 1 sena) is-sustanza tat-test titqies idrolitikament stabbli u, normalment, ma hu meħtieġ ebda ttestjar addizzjonali. Jekk is-sustanza hija magħrufa li hija instabbli f'temperaturi ambjentalment rilevanti ([2]), it-test preliminari mhuwiex meħtieġ. Il-metodu analitiku għandu jkun preċiż u sensittiv biżżejjed biex jiġi skopert tnaqqis ta' 10 fil-mija fil-konċentrazzjoni inizjali.

([1]) Mabey u Mill jirrakkomandaw l-użu ta' buffers tal-borate u ta' l-aċetat minflok il-fosfat (11).

([2]) Din l-informazzjoni tista' tiġi minn għejun oħrajn bħad-data ta' l-idrolisi ta' komposti strutturalment simili mil- letteraturi jew minn testijiet oħrajn preliminarji, semi-kwantattivi bis-sustanza tat-test fi stadju aktar bikri ta' l-iżvilupp.

▼B

1.8.5.2. *L-idrolisi ta' sustanzi mhux stabbli (Livell 2)*

It-test tal-Livell Ogħla (avvanzat) għandu jsir fil-valuri pH li fihom is-sustanza tat-test tinstab instabbli kif definit mit-test preliminari hawn fuq. It-taħlitiet *buffered* tas-sustanza tat-test għandhom ikunu termostatati fit-temperaturi magħżula. Biex isir it-test għall-imġieba ta' l-ewwel ordni, kull reazzjoni tat-taħlita għandha tiġi analizzata f'intervalli ta' żmien li jipprovdu minimu ta' sitt punti ta' data spazjati bejn 10 % u 90 % ta' l-idrolisi tas-sustanza tat-test. Il-kampjuni replikati tat-test individwali (minimu ta' kampjuni duplikati li jinsabu f'kontenituri separati tar-reazzjoni) għandhom jitneħħew u l-kontenuti jiġu analizzati f'kull wieħed mis-sitt drabi tat-teħid tal-kampjuni (għal mhux inqas minn tnax-il punt tad-data doppja). L-użu ta' kampjun kbir wieħed li minnhom jitneħħew l-*aliquots* individwali tat-taħlita tat-test f'kull intervall tat-teħid tal-kampjuni jitqies li mhux xieraq, għaliex ma jippermettix l-analiżi tal-varjabbiltà tad-data u jista' jwassal għal problemi bil-kontaminazzjoni tat-taħlita tat-test. It-testijiet tal-konferma ta' l-isterilità għandhom isiru fl-aħħar tat-test tal-Livell ogħla (jiġifieri f'90 % idrolisi jew 30 jum). Iżda, jekk ma tiġi osservata ebda degradazzjoni (jiġifier t-trasformazzjoni), it-testijiet ta' l-isterilità ma jitqisux meħtieġa.

1.8.5.3. *L-identifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi (Livell 3)*

Kwalunkwe prodott ewlieni ta' l-idrolisi għall-inqas dawk li jirrappreżentaw > 10 % tad-doża applikata għandu jiġi identifikat b'metodi xierqa analitika.

1.8.5.4. *Testijiet mhux obbligatorji*

It-testijiet addizzjonali f'valuri pH minbarra 4, 7 u 9 jistgħu jkunu meħtieġa għal sustanza tat-test idrolitikament instabbli. Per eżempju, għall-iskopijiet fiżjoloġiċi jista' jkun meħtieġ test taħt kondizzjonijiet aktar aċiduži (eż. pH 1.2) bl-użu ta' temperatura unika fiżjoloġikament rilevanti (37 ºC).

2. **DATA**

L-ammonti tas-sustanza tat-test u tal-prodotti ta' l-idrolisi, jekk rilevanti, għandhom jingħataw bħala perċentwal tal-konċentrazzjoni inizjali applikata u, fejn xieraq, bħala mg/L għal kull interval tat-teħid tal-kampjuni u għal kull pH u temperatura tat-test. Barra minn dan, għandu jingħata bilanċ tal-massa f perċentwali tal-konċentrazzjoni inizjali applikata meta ntużat sustanza tat-test ittikkettjata.

Preżentazzjoni grafika tad-data ta' logs trasformati tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test maż-żmien għandha tiġi rrapportata. Kwalunkwe prodott ewlieni ta' l-idrolisi għall-inqas dawk li jirrappreżentaw ≥ 10 % tad-doża applikata li għandu jiġi identifikat bil-konċentrazzjonijiet tal-logs trasformati għandu wkoll jista' jiġi ppjanat bl-istess mod bħas-sustanza ewlenija biex jidhru r-rati tal-formazzjoni u tat-tnaqqis tagħhom.

▼B

2.1. IT-TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Determinazzjonijiet aktar preċiżi ta' *half-lives* jew ta' valuri DT_{50} għandha tinkiseb bl-applikazzjoni ta' kalkoli xierqa tal-mudelli kinetiċi il-valuri *t*al-*half-life* u/jew DT_{50} (inklużi l-limiti tal-kunfidenza) għandhom jiġu rrapportati għal kull pH u kull temperatura flimkien ma' deskrizzjoni tal-mudell użat, l-ordni tal-kinetika u l-koeffiċjenti tad-determinazzjoni (r^2). Jekk xieraq, il-kalkoli għandhom ukoll jiġu applikati għall-prodotti ta' l-idrolisi.

Fil-każ ta' studju ta' rati mwettqa f temperaturi differenti, il-kostanti ta' l-idrolisi tal-psewdo-ewwel ordni (k_{obs}) għandhom jiġu deskritti bħala funzjoni tat-temperatura. Il-kalkolu għandu jiġi bbażat fuq kemm is-separazzjoni tal-kobs f kostanti tar-rati għall-idrolisi katalizzata bl-aċidu, newtrali u kkatalizzati bil-bażi (k_H, $k_{neutral}$, u k_{OH} rispettivament) u l-ekwazzjoni ta' Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

fejn Ai u Bi huma kostanti tar-rigressjoni mill-interċett u l-gradjent, rispettivament, tal-linji li joqogħdu l-aħjar iġġenerati mir-rigress lineari ln ki kontra r-reċiproku tat-temperatura assoluta f Kelvin (T). Bl-użu tar-relazzjonijiet ta' Arrhenius għall-idrolisi kkatalizzata aċida, newtrali u bażi, il-kostanti tar-rata psewdo l-ewwel ordni, u għalhekk *half-lives* jistgħu jiġu kkalkolati għal temperaturi oħrajn li għalihom id-determinazzjoni diretta esperimentali tal-kostant tar-rata mhijiex prattikabbli (10).

2.2. L-EVALWAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Il-parti l-kbira tar-reazzjonijiet ta' l-idrolisi jsegwu r-rati apparenti tar-reazzjonijiet ta' l-ewwel ordni u, għalhekk, il-*half-lives* huma indipendenti mill-konċentrazzjoni (ara l-ekwazzjoni 4 fl-Anness 2). Dan normalment jippermetti l-applikazzjoni tar-riżultati tal-laboratorju determinati bħala 10^{-2} sa 10^{-3} M għal kondizzjonijiet ambjentali ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Bosta eżempji ta' ftehim tajjeb bejn ir-rati ta' l-idrolisi mkejla f'ilmijiet kemm puri kif ukoll naturali għal varjetà ta' kimiċi ġew irrapportati minn Mabey u Mill (11), kemm-il darba kemm il-pH kif ukoll it-temperatura kienu tkejlu.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi għall-inqas din l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— isem komuni, isem tal-kimika, CAS numru, formula strutturali (li tindika l- pożizzjoni tat-tikketta meta jintuża materjal radjotikkettjat) u karatteristiċi rilevanti fiżiċi-kimiċi (ara t-taqsima 1.5);

— purità (impuritajiet) tas-sustanza tat-test;

— purità tat-tikketta ta' kimika ttikkettjata u attività molari (fejn xieraq).

▼B

— taħlitiet *buffer*:

— dati u dettalji tal-preparazzjoni

— *buffers* u ilmijiet użati;

— molarità u pH tat-taħlitiet *buffer*.

Il-kondizzjonijiet tat-test:

— id-dati tat-twettiq ta' l-istudji;

— l-ammont tas-sustanza tat-test applikati;

— il-metodu u s-solventi (tip u ammont) użati għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;

— il-volum tat-taħlitiet *buffered* tas-sustanza tat-test inkubati;

— deskrizzjoni tas-sistema ta' inkubazzjoni użata;

— pH u temperatura matul l-istudju;

— ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni;

— metodu/i ta' l-estrazzjoni;

— metodi biex jiġu kkwantifikati u identifikati s-sustanza tat-test u l-prodotti ta'l- idrolisi tagħha fit-taħlitiet *buffer*;

— għadd ta' replikati.

Riżultati:

— repetibbiltà u sensittività tal-metodi analitiċi użati;

— rkupru (valuri % għal studju validu jingħataw fit-taqsima 1.7.1);

— *data* replikata u mezzi f'forom tabulari;

— bilanċ tal-massa matul u fl-aħħar ta' l-istudji (meta tintuża sustanza tat-test ittikkettjata);

— riżultati tat-test preliminari;

— diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;

— id-*data* u l-figuri kollha oriġinali.

Din l-informazzjoni li ġejja hija meħtieġa biss meta hija ddeterminata r-rata ta' l- idrolisi:

— ippjanar fuq dijagramma ta' konċentrazzjonijiet kontra ħin għas-sustanzi tat-testu, fejn xieraq, għall-prodotti ta' l-idrolisi għal kull valur ta' pH u temperatura;

— tabelli tar-riżultati ta' l-ekwazzjoni Arrhenius għat-temperatura 20 °C/25 °C, bil-pH, kostant tar-rata [h-1 jew jum-1], *half-life* jew DT50, temperaturi [°C] inklużi limiti tal-kunfidenza u l-koeffiċjenti tal-korrelazzjoni (r_2) jew informazzjoni komparabbli;

— rotta proposta ta' l-idrolisi.

▼B

4. **REFERENZI**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

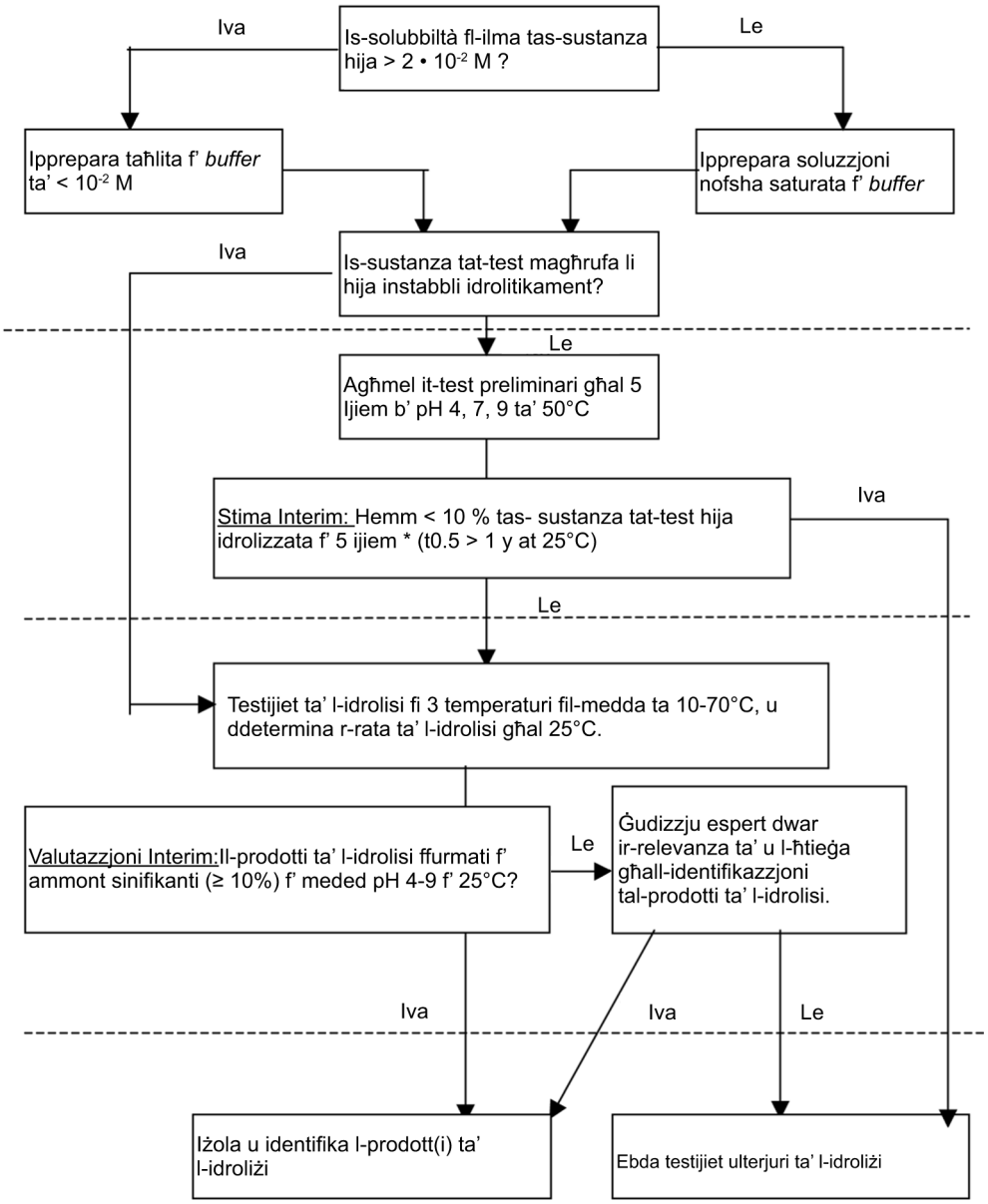
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

ANNESS 1

Tiered Hydrolysis Test Scheme



* 10% hydrolysis of a test substance at 50°C corresponds to a half-life of approx. 30 days which corresponds to a value of approx. 1 year at 20°C.

▼B

ANNESS 2

Definizjonijiet u Unitajiet

L-Unitajiet In d Inte w fi kwalunkwe każ.

Sustanza tat-Test: kwalunkwe sustanza, kemm jekk il-kompost ewlieni kif ukoll prodotti rilevanti tat-trasformazzjoni.

Prodotti tat-trasformazzjoni: is-sustanzi kollha li jirriżultaw minn reazzjonijiet biotiċi jew abiotiċi tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test.

Prodotti ta' l-idrolisi: is-sustanzi kollha li jirriżultaw mir-reazzjonijiet tat-trasformazzjoni idrolitika tas-sustanza tat-test.

Idrolisi tirreferi għal reazzjoni ta' sustanza tat-test RX ma' l-ilma, bl-iskambju nett tal-grupp X ma' l-OH fiċ-ċentru tar-reazzjoni:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Ir-rata li biha l-konċentrazzjoni ta' RX tonqos f'dan il-proċess simplifikat tingħata b'

$$\text{rata} = k\,[H_2O]\,[RX]$$ reazzjoni tat-tieni ordni

jew

$$\text{rata} = k\,[RX]$$ reazzjoni ta' l-ewwel ordni

skond il-pass li jiddetermina r-rata. Minħabba li l-ilma huwa preżenti f'eċċess kbir meta mqabbel mas-sustanza tat-test, dan it-tip ta' reazzjoni normalment huwa deskritt bħala reazzjoni tal-psewdo-ewwel ordni fejn il-kostant tar-rata osservat jingħata bir-relazzjoni

$$k_{obs} = k\,[H_2O] \qquad [2]$$

u jista' jiġi ddeterminat mill-espressjoni (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t}\ln\frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

fejn

t = ħin

u C_o, C_t = konċentrazzjonijiet ta' RX fil-ħinijiet 0 u t.

L-*unitajiet* ta' dan il-konstant għandhom id-dimensjonijiet ta' $(\text{ħin})^{-1}$ u l-*half-life* tar-reazzjoni (ħin biex 50 % ta' RX jirreaġixxi) jingħata b'

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Half-life: ($t_{0,5}$) huwa l-ħin meħud għal 50 % idrolisi ta' sustanza tat-test meta r-reazzjoni tista' tiġi deskritta b'kinetiċi ta' l-ewwel ordni; huwa indipendenti mill-konċentrazzjoni.

(*) Jekk it-tpinġija fuq djagramma tad-*data* ta' *logs* ittrasformati ta' *data vs*. ħin ma tindikax funzjoni lineari (ekwata ma' rata ta' reazzjoni ta' l-ewwel ordni), allura l-użu ta' l-ekwazzjoni [3] mhuwiex xieraq biex jiġi ddeterminat il-konstant tar-rata ta' l-idrolisi tal-kompost tat-test.

▼B

DT_{50} (*Disappearance Time* (ħin biex jisparixxi) 50): huwa l-ħin li fih il-konċentrazzjoni tat-test titnaqqas b'50 %; huwa different mill-*half-life* $t_{0,5}$ meta r-reazzjoni ma ssegwix kinetiċi ta' l-ewwel ordni.

Stima ta' k f'temperatura differenti

Meta l-konstanti tar-rata huma magħrufa għal żewġ temperaturi, il-kostanti tar-rata f'temperaturi oħrajn jistgħu jiġu kkalkolati bl-użu ta' l-ekwazzjoni ta' Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ jew } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Tpinġija fid-djagramma ta' ln k versus 1/T tagħti linja dritta bi gradjent ta'–E/R

Fejn

k = kostant tar-rata, imkejjel b'temperaturi differenti

E = enerġija ta' l-attivazzjoni [kJ/mol]

T = temperatura assoluta [K]

R = kostant tal-gass [8,314 J/mol.K]

L-enerġija ta' l-attivazzjoni ġiet ikkalkolata bl-analiżi tar-rigressjoni jew l-ekwazzjoni li ġejja:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

fejn: $T_2 > T_1$.

▼B

L-ANNESS 3

Sistemi *Buffer*

A. **CLARK U LUBS:**

Taħlitiet *Buffer* ta' CLARK u LUBS (*)

Kompożizzjoni	pH
0,2 N HCl U 0,2 N KCl AT 20 ºC	
47,5 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,0
32,25 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,2
20,75 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,4
13,15 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,6
8,3 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,8
5,3 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	2,0
3,35 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	2,2
0,1 M potassium biphthalate + 0,1 N HCl f'temperatura ta' 20 ºC	
46,70 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,2
39,60 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,4
32,95 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,6
26,42 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,8
20,32 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,0
14,70 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,2
9,90 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,4
5,97 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,6
2,63 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate to 100 ml	3,8
0,1 M potassium biphthalate + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 ºC	
0,40 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,0
3,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,2
7,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,4
12,15 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,6
17,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,8

(*) Il-valur pH irrapportati f'dawn it-tabelli ġew ikkalkolati mill-kejl potenzjali bl-użu ta' ekwazzjonijiet standard ta' Sörensen (1909). Il-valuri pH korrispondenti huma 0,04 unitajiet oqħla mill-valuri tabulate.

▼B

Kompożizzjoni	pH
23,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,0
29,95 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	5,2
35,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,4
39,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,6
43,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	5,8
45,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	6,0

Taħlitiet *Buffer* ta' CLARK u LUBS (Ikompli)

0,1 M monopotassium phosphate + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 ºC	
5,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,0
8,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,2
12,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,4
17,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,6
23,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,8
29,63 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,0
35,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,2
39,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,4
42,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,6
45,20 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,8
46,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 ºC	
2,61 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	7,8
3,97 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,0
5,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,2
8,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,4
12,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,6
16,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,8
21,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,0
26,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,4
36,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,6
40,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,8
43,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF U VLEESCHHOUWER:**

***Buffers* taċ-ċitrat ta' KOLTHOFF u VLEESCHHOUWER**

Kompożizzjoni	pH
0,1 M ċitrat tal-monopotassju u 0,1 N HCl f'temperatura ta' 18 ºC (*)	
49,7 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,2
43,4 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,4
36,8 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,6
30,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,8
23,6 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,0
17,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,2
10,7 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,4
4,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,6
0,1 M ċitrat tal-monopotassju u 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 18 ºC (*)	
2,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,8
9,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,0
16,3 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,2
23,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,4
31,5 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,6
39,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,8
46,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,0
54,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,2
61,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,4
68,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,6
74,4 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,8
81,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	6,0

(*) Żid kristall żgħir ħafna ta' timol jew sustanza simili biex jitrażżan it-tkabbir tal-moffa.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Tabelliet Borate ta' SÖRENSEN

Kompożizzjoni		Sörensen 18 °C	Walbum, pH f'temperatura ta'		
ml. Borax	ml. HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Tabelliet tal-fosfat ta' SÖRENSEN

Kompożizzjoni	pH
0,0667 M Monopotassium phosphate + 0,0667 M Disodium phosphate f'temperatura ta' 20 °C	
99,2 ml. KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml. KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml. KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml. KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml. KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml. KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml. KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml. KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml. KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml. KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml. KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml. KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml. KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml. KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml. KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml. KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **IT-TOSSIĊITÀ 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 sebat'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

LC_{50}: 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 użata 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 użata. 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 sebat'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 użata 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 mitħun fin),

▼B

— 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, miż

— Madwar 1 % karbonat tal-kalċju ($CaCO_3$), fi trab, kimikament pur, żjud 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.

(ċ) 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-konteniturі ta' l-ittestjar

Il-konteniturі 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-konteniturі għandhom jinżammu fi kmamar klimatiċi f'temperatura ta' 20 ± 2 °C 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' sebat'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.

▼B

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 LC_{50} 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- LC_{50}.

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 miħun 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.

▼B

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- LC_{50} u l-limiti tal-kunfidenza (p = 0,05) għandhom ikunu determinati billi jintużaw il-metodi standard (Litchfield u Wilcoxon, 1949, għall-metodu ekwivalenti). L- LC_{50} 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- LC_{50}, 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-LC_{50}.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

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),

▼B

— il-metodu użat għad-determinazzjoni ta' l- LC_{50},

— ir-riżultati tat-test inkluża d-data kollha użata,

— id-deskrizzjoni tas-sintomi jew il-bidliet osservati fl-aġir ta' l-organismi tat-test,

— il-mortalità fil-kontrolli,

— l- LC_{50} 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. **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, Institut 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 "Toxizit-atstest am Regenwurm Eisenia foetidia in kunstlichem Boden", f': Rudolph/Boje, Okotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

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.

▼B

C.9. **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' mikroorganiżmi f'test statiku.

L-assorbiment fiżikukimiku 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 1 000 mg/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 użata 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.

▼B

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-degradazzjoni bijoloġika (%) fil-ħin T,

CA = DOC (jew COD) valuri fit-taħlita tat-test imkejla tlett siegħat 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, mkejla tlett siegħat 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 siegħat 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 to 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 siegħat 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 imkejla (bijodegradabilità primarja).

▼B

1.5. IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ

Ir-riproduċibilità ta' dan it-test ġie pruvat li hi 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. I r - r e a ġ e n t i

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.):	50 g/l
Is-soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju A.R.:	40 g/l
Is-soluzzjoni nutrijenti tal-minerali: ħoll f'litru ilma dejonizzat:	
Il-klorit ta' l-ammonja, NH4Cl, 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.

It-taħlita sservi kemm bħala nutrijent u kemm bħala sistema ta' *buffering*.

1.6.1.2. L - a p p a r a t

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.

ċentrifugu (madwar 3 550 g).

Il-metru tal-pH.

Il-metru ta' l-ossiġnu maħlul.

Il-filtri tal-karta.

▼B

L-apparat tal-filtrazzjoni tal-membran.

Il-filtri tal-membra, il-qies tal-pora ta' 0,45 nm. 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, eċċ.). 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 1,0 g/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 1 000 mg/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.

▼B

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.

▼B

Il-mezzi analitiċi

Normalment il-kampjuni jiġu ffiltrati minn ġo passatur tal-karti maħsul sew (għal ħasil uża l-ilma deonizzat).

Il-kampjuni li jibqgħu mdardra jiġu ffiltrati minn ġo filtri tal-membran (0,45 μm).

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 UL-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-RAPPORTAGG**

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 użata, eċċ.,

— 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.

▼B

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) fittest 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-riżultati jingħataw fit-termini tal-bijodegradazzjoni 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-Anness 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.

▼B

L-Appendiċi:

L-EŻEMPJU TAL-VALUTAZZJONI

Il-kompost organiku:	L-aċidu 4-Ethoxybenzoic
Il-konċentrazzjoni teoretika tat-test:	600 mg/l
Id-DOC teoretiku:	390 mg/l
Is-sostanza tat-tilqim	L-impjant tat-trattament tal-ħmieġ tad-drenaġġ ta'
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-tossiċità:	L-ebda effetti toxiċi taħt l-1 000 mg
	It-test użat: Il-fermentazzjoni tat-tubi tat- test

Il-ħin tat-test	Is-sustanza tal-kontroll				Is-sustanza tat-test		
	Id-DOC vojt mg/l	Id-DOC mg/l	Id-DOC nett mg/l	Id-degradazzjoni %	Id-DOC mg/l	Id-DOC nett mg/l	Id-degradazzjoni %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 siegħat	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

▼B

Figura 1

Eżempji tal-kurvi tal-bijodegradazzjoni

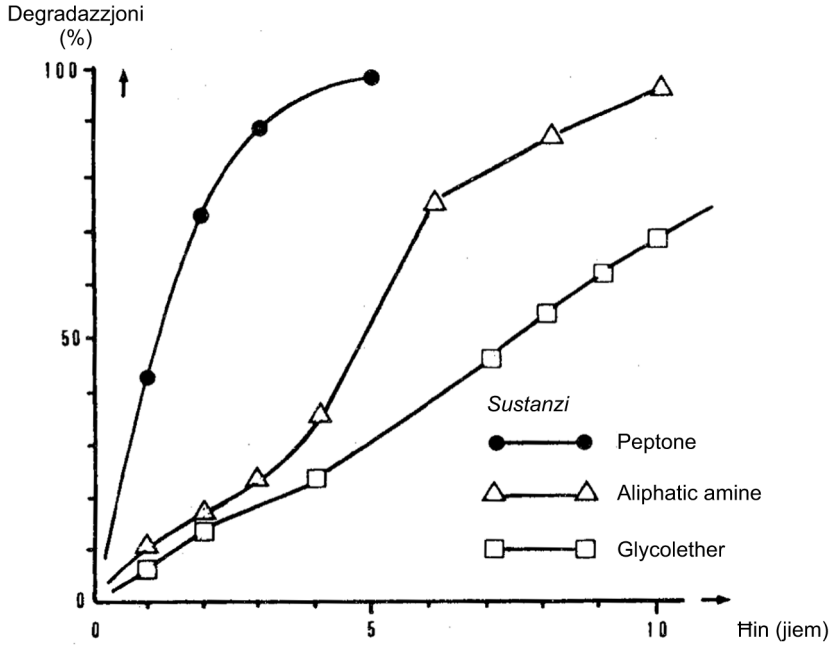
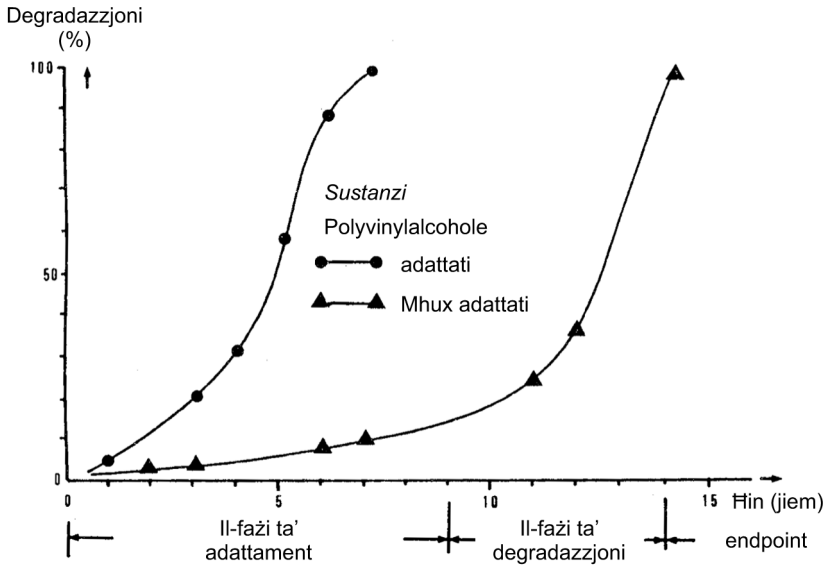


Figura 2

Eżempji ta' l-adattazzjoni tat-tajn oħxon



▼M4

C.10. **TRATTAMENT TA' SIMULAZZJONI TESTAEROBIKA TAD-DRANAĠĠ: C.10-A: UNITAJIET TA' HAMA ATTIVAT - C.10-B: BIJORITI**

C.10-A: Unitajiet ta' Hama Attivat

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 303 (2001) tal-OECD. Fil-ħamsinijiet (1950s) kien irrealizzat li tensjoattivi li kienu għadhom kif ġew introdotti kienu jikkawżaw ragħwa eċċessiva f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi u fix-xmajjar. Ma kinux tneħħew għalkollox fit-trattament aerobiku u f'xi każijiet kienu llimitaw it-tneħħija ta' materja organika oħra. Dan ġiegħel li jsiru ħafna investigazzjonijet dwar kif setgħu jitneħħew tensjoattivi minn ilmijiet mormija u jekk kimiċi ġodda prodotti mill-industrija setgħux ikunu ttrattati b'ilma mormi. Biex dan isir, intużaw unitajiet mudelli li kienu jirrappreżentaw iż-żewġ tipi ewlenin ta' trattament aerobiku u bijoloġiku ta' ilma mormi (ħama attivat u jnixxi, jew iqattar, jiffiltra). Ma kienx ikun prattikabbli u kien jiswa ħafna li kull kimika ġdida titqassam u li jsir monitoraġġ ta' impjanti tat-trattament ta' skala kbira, anki fuq bażi lokali.

KONSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

Unitajiet ta' ħama attivat

2. Unitajiet mudell ta' ħama attivat ġew deskritti li jvarjaw fid-daqs minn 300 ml sa madwar 2 000 ml. Uħud imitaw ħafna l-impjanti ta' skala reali, li jkollhom tankijiet li fihom toqgħod il-ħama fejn il-ħama li jkun qagħad jiġi ppumpjat lura fit-tank tal-arja, filwaqt li oħrajn ma pprovdewx faċilitajiet tat-tqegħid, eż. Swisher (1). Id-daqs tal-apparat huwa kompromess: minn naħa waħda għandu jkun kbir biżżejjed biex l-operazzjoni mekkanika tirnexxi u biex ikun ipprovdut volum suffiċjenti ta' kampjuni mingħajr ma tintlaqat l-operazzjoni; filwaqt li minn naħa oħra l-apparat m'għandux ikun daqshekk kbir li jkun jeħtieġlu spazju u materjali eċċessivi.

3. Żewġ għamliet ta' apparat li ntużaw b'mod estensiv u sodisfaċenti huma l-unitajiet Husmann (2) u l-unitajiet ta' Borma Poruża (3)(4), tal-ewwel użati fl-istudju ta' tensjoattivi; dawn huma deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar. Oħrajn intużaw ukoll b'mod sodisfaċenti, eż. Eckenfelder (5). Minħabb li kienu jiswew relattivament ħafna u minħabba l-isforz li kien meħtieġ biex ikun applikat dan it-test ta' simulazzjoni, kienu mistħarrġa fl-istess żmien testijiet ta' tgħarbil aktar sempliċi u orħos, li issa jinsabu inkorporati fil-kapitolu C.4 A-F ta' dan l-Anness (6). L-esperjenza minn ħafna tensjoattivi u kimiċi oħra wriet li dawk li għaddew mit-testijiet tat-tgħarbil (bijodegradabbli faċilment) iddegradaw ukoll fit-test ta' simulazzjoni. Xi whud minn dawk li m'għaddewx mit-testijiet tat-tgħarbil għaddew mit-testijiet tal-bijodegradabbiltà inerenti (il-Kapitoli C.12 (7) u C.19 (8) ta' dan l-Anness), iżda ftit biss minn dan il-grupp tal-aħħar kienu ddegradati fit-test ta' simulazzjoni, filwaqt li dawk il-kimiċi li m'għaddewx minn testijiet għall-bijodegradabbiltà inerenti ma ddegradawx fit-testijiet ta' simulazzjoni (9)(10)(11).

4. Għal xi għanijiet, testijiet ta' simulazzjoni mwettqin skont sett wieħed ta' kondizzjonijiet operazzjonali jkunu suffiċjenti; ir-riżultati jkunu espressi bħala perċentwali ta' tneħħija tal-kimika għall-ittestjar jew tal-karbonju organiku maħlul (DOC). Deskrizzjoni ta' test bħal dan tingħata f'dan il-Metodu ta' Ttestjar. Iżda, mhux bħal verżjoni ta' qabel ta' dan il-Kapitolu, li ddeskriviet tip wieħed biss ta' apparat li jittratta dranaġġ

▼M4

sintetiku fil-modalità akkoppjata bl-użu ta' metodu relattivament primittiv ta' rimi ta' ħama, dan it-test joffri għadd ta' varjazzjonijiet. Huma deskritti alternattivi għat-tip ta' apparat, modalità ta' tħaddim, dranaġġ u tneħħija ta' rimi ta' ħama. Dan it-test isegwi mill-qrib dak ta' ISO 11733 (12), li kien eżaminat bir-reqqa matul it-tħejjija tiegħu, għalkemm il-metodu ma tqiegħedx għal ringtest.

5. Għal għanijiet oħra, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent jeħtiġilha tkun magħrufa b'aktar akkuratezza u għal dan jeħtieġ metodu aktar estensiv. Pereżempju, ir-rata ta' rimi ta' ħama għandha tkun ikkontrollata b'mod aktar preċiż tul kull ġurnata u tul il-perjodu tat-test, u unitajiet għandhom jitħaddmu f'għadd ta' rati ta' rimi. Għal metodu għal kollox komprensiv, testijiet għandhom isiru wkoll f'żewġ jew fi tliet temperaturi differenti: metodu bħal dan huwa deskritt minn Birch (13)(14) u huwa miġbur fil-qosor fl-Appendiċi 6. Iżda t-tagħrif li għandna preżentament mhux suffiċjenti biex ikun deċiż liema mill-mudelli kinetiċi huma applikabbli għall-bijodegradazzjoni ta' kimiċi fi trattament ta' ilma mormi u ġeneralment fl-ambjent akwatiku. L-applikazzjoni tal-kinetika Monod, mogħtija fl-Appendiċi 6 bħala eżempju, hija limitata għal kimiċi li jkun hemm f'1 mg/l u msemmija hawn fuq, iżda l-opinjoni ta' xi whud hija li anki din fadlilha tkun issustanzjata. Testijiet f'konċentrazzjonijiet li jirriflettu aktar tassew dawk misjubin f'ilmijiet mormija huma indikati fl-Appendiċi 7, iżda testijiet bħal dawn, u dawk fl-Appendiċi 6, huma inklużi f'Appendiċijiet minflok ma jinħarġu bħala Metodi ta' Ttestjar separati.

Filtri

6. Ingħatat anqas attenzjoni lil filtri mudelli li jnixxu, forsi minħabba li huma aktar skomdi u anqas kompatti minn mudelli ta' impjanti ta' ħama attivat. Gerike *et al* żviluppaw unitajiet tal-filtri jnixxu (trickling) u operawhom fil-mod akkoppjat ((15). Dawn il-filtri kienu relattivament kbar (għoli ta' 2 m; volum ta' 60 l) u kull wieħed kien jirrikjedi sa 2 l/h ta' dranaġġ. Baumann et al (16) issimulaw il-filtri li jnixxu billi daħħlu strixxi tal-polyester "fleece" f'tubi ta' 1 m (dijametru intern ta' 14 mm) wara li l-istrixxi ddaħħlu fil-ħama attivata konċentrata għal 30 minuta. Il-kimika għall-ittestjar bħala sors uniku ta' C f'soluzzjoni ta' mluħa minerali tferrat minn tubu vertikali u l-bijodegredazzjoni ġiet ivvalutata minn kejlijiet ta' DOC fl-effluwent u d-CO_2 fil-gass li ħareġ.

7. Biofiltri kienu ssimulati mod ieħor (15); l-uċuħ ta' ġewwa ta' tubi li jduru, inklinati f'angolu żgħir mal-orizzontali, tqegħdilhom dranaġġ (madwar 250 ml/h) bi u mingħajr il-kimika għall-ittestjar, u l-effluwenti miġbura kienu analizzati għal DOC u/jew għall-kimika speċifika tat-test.

PRINĊIPJU TA' TTESTJAR

8. Dan il-metodu huwa mfassal biex ikunu ddeterminati l-eliminazzjoni u l-bijodegradazzjoni primarja u/jew finali ta' kimiċi organiċi li jinħallu fl-ilma b'mikroorganiżmi aerobiċi f'sistema ta' ttestjar imħaddma kontinwament li tissimula l-proċess ta' ħama attivat. Midjum organiku faċilment bijodegradabbli u l-kimika organika tat-test huma s-sorsi ta' karbonju u enerġija għall-mikroorganiżmi.

9. Żewġ unitajiet ta' ttestjar imħaddmin kontinwament (impjanti ta' ħama attivat jew borom poruži) jintużaw fl-istess waqt f'kondizzjonijiet identiċi li jintgħażlu biex ikunu adatti għall-fini tat-test. Normalment il-ħin medju ta' retenzjoni idrawlika jkun ta' 6 sigħat u l-ħama jkollu żmien medju (żmien ta' retenzjoni ta' ħama) ta' minn 6 sa 10 ijiem. Il-ħama jintrema b'wieħed minn żewġ metodi, il-kimika għall-ittestjar normalment tiżdied f'konċentrazzjoni ta' bejn 10 mg/l ta' karbonju organiku maħlul (DOC) u 20 mg/l DOC, mal-influwent (midjum organiku) ta' waħda biss mill-unitajiet. It-tieni unità tintuża bħala unità ta' kontroll biex tkun iddeterminata l-bijodegradazzjoni tal-midjum organiku.

▼M4

10. F'kampjuni meħudin sikwit tal-effluwenti, ikun iddeterminat id-DOC, preferibbilment, jew id-domanda kimika ta' ossiġnu (COD), flimkien mal-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (jekk ikun meħtieġ) b'analiżi speċifika, fl-effluwent mill-unità li tirċievi l-kimika għall-ittestjar. Id-differenza bejn il-konċentrazzjonijiet ta' effluwenti ta' DOC jew ta' COD fl-unitajiet ta' ttestjar u ta' kontroll hija prežunta li tkun dovuta minħabba l-kimika għall-ittestjar jew il-metaboliti organiċi tagħha. Din id-differenza titqabbel mal-konċentrazzjoni ta' influwenti ta' DOC jew ta' COD minħabba kimika għall-ittestjar miżjuda biex tkun iddeterminata l-eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

11. Il-bijodegradazzjoni tista' normalment tingħaraf minn bijosorbiment b'eżami sewwa tal-kurva ta' eliminazzjoni-żmien/ħin u tista' s-soltu tkun ikkonfermata bl-applikazzjoni ta' test għal bijodegradazzjoni faċli billi tintuża tilqima akklimatizzata mill-unità li tirċievi l-kimika għall-ittestjar.

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR

12. Il-purezza, is-solubilità fl-ilma, il-volatilità u l-karatteristiċi ta' sorbiment tal-kimika għall-ittestjar għandhom ikunu magħrufin biex tkun tista' ssir interpretazzjoni korretta ta' riżultati. Normalment kimiċi volatili u li ma jinħallux ma jistgħux ikunu ttestjati sakemm ma jitteħdux prekawzjonijiet speċjali (ara l-Appendiċi 5). L-istruttura kimika, jew tal-anqas il-formula empirika, ukoll għandhom ikunu magħrufin biex ikunu kkalkulati valuri teoretiċi u/jew biex ikunu vverifikati valuri mkejla ta' parametri, eż. domanda teoretika ta' ossiġnu (ThOD), karbonju organiku maħlul (DOC) u domanda kimika ta' ossiġnu (COD).

13. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganiżmi (ara l-Appendiċi 4) tista' tkun utli biex jintgħażlu konċentrazzjonijiet tat-test adatti u tista' tkun essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri baxxi ta' bijodegradazzjoni.

LIVELLI TA' PASS

14. Fl-applikazzjoni oriġinali ta' dan it-test ta' simulazzjoni (konfermatorju) għall-bijodegradazzjoni primarja ta' tensjoattivi, tkun meħtieġa tneħħija ta' aktar minn 80 % tal-kimika speċifika qabel ma t-tensjoattiv jitqiegħed fis-suq. Jekk il-valur ta' 80 % ma jintlaħaqx, jista' jkun applikat dan it-test ta' simulazzjoni (konfermatorju) u t-tensjoattiv ikun jista' jitqiegħed fis-suq biss jekk titneħħa aktar minn 90 % tal-kimika speċifika. Għal kimiċi inġenerali mhix kwistjoni ta' jekk ikunx hemm pass/falliment u l-valur ta' perċentwali ta' tneħħija miksub jista' jintuża f'kalkulazzjonijiet prossimi tal-konċentrazzjoni ambjentali probabbli biex jintuża fi stimi tal-perikli li jġibu kimiċi. Riżultati aktarx isegwu xejra ta' kollox jew xejn. F'għadd ta' studji tal-kimiċi puri l-perċentwali ta' tneħħija ta' DOC instab li kien > 90 % f'aktar minn tliet kwarti u > 80 % f'aktar minn 90 % tal-kimiċi li wrew xi grad sinifikanti ta' bijodegradabbiltà.

15. Relattivament ftit kimiċi (eż. tensjoattivi) jinsabu fid-dranaġġ fil-konċentrazzjonijiet (madwar 10 mg C/l) użati f'dan it-test. Xi kimiċi jistgħu jkunu inibitorji f'dawn il-konċentrazzjonijiet, filwaqt li l-kinetika ta' tneħħija ta' oħrajn tista' tkun differenti f'konċentrazzjonijiet baxxi. Tista' ssir valutazzjoni aktar akkurata tad-degradazzjoni billi jintużaw metodi modifikati, bl-użu ta' konċentrazzjonijiet realistikament baxxi tal-kimika għall-ittestjar, u d-dejta miġbura tkun tista' tintuża biex ikunu kkalkulati kostanti kinetiċi. Iżda t-tekniki sperimentali meħtieġa għadhom ma ġewx ivvalidati għalkollox u lanqas ma għadhom ġew stabbiliti l-mudelli kinetiċi li jiddeskrivu r-reazzjonijiet ta' bijodegradazzjoni (ara l-Appendiċi 7).

▼M4

KIMIĊI TA' REFERENZA

16. Biex ikun żgurat li l-proċedura sperimentali tkun qed titwettaq b'mod korrett, ikun utli kull tant żmien li jkunu ttestjati l-kimiċi li l-imġiba tagħhom tkun magħrufa fl-istess waqt meta jkunu mistħarġa l-kimiċi għall-ittestjar. Kimiċi bħal dawn jinkludu aċidu adipiku, 2-fenil fenol, 1-naftol, aċidu difeniku, 1-aċidu naftoiku, eċċ. (9)(10)(11).

RIŻULTATI RIPRODUĊIBBLI TA' TESTIJIET

17. Kien hemm bil-wisq anqas rapporti ta' studji ta' testijiet ta' simulazzjoni milli ta' testijiet għal bijodegradabbiltà faċli. Riproduċibbiltà bejn replikati (simultanji) hija tajba (f'10-15 %) għall-kimiċi għall-ittestjar iddegradati bi 80 % jew aktar, iżda għall-kimiċi anqas iddegradati sewwa l-varjabbiltà hija akbar. Ukoll għal xi kimiċi dubjużi kienu rreġistrati riżultati differenti għal-kollox minn xulxin (eż. 10 %, 90 %) f'okkażjonijiet differenti fi żmien 9 ġimgħat permessi fit-test.

18. Ftit instabet differenza f'riżultati miksubin biż-żewġ tipi ta' apparat, iżda xi kimiċi kienu aktar iddegradati b'mod estensiv u konsistenti meta kien hemm dranaġġ domestiku milli minn dranaġġ sintetiku tal-OECD.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Apparat

Sistema ta' ttestjar

19. Is-sistema ta' ttestjar għal kimika waħda ta' ttestjar tikkonsisti minn unità ta' ttestjar u minn unità ta' kontroll; iżda meta ssir analiżi speċifika waħda (bijodegradazzjoni primarja), tkun meħtieġa biss unità ta' ttestjar. Tista' tintuża unità waħda ta' kontroll għal diversi unitajiet ta' ttestjar li jirċievu l-kimiċi għall-ittestjar li jkunu l-istess jew differenti. Fil-każ ta' akkoppjar (Appendiċi 3) kull unità ta' ttestjar għandu jkollha unità ta' kontroll tagħha stess. Is-sistema ta' ttestjar tista' tkun jew ta' mudell ta' impjant ta' ħama attivat, unità Husmann (Appendiċi 1, Figura 1) jew borma poruża (Appendiċi 1, Figura 2). Fiż-żewġ każijiet ikunu meħtieġa reċipjenti ta' ħżin ta' daqs suffiċjenti għall-influwenti u l-effluwenti, kif ukoll pompi biex jiddożaw l-influwent, mħallat ma' soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar jew b'mod separat.

20. Kull unità ta' impjant ta' ħama attivat tikkonsisti minn reċipjent ta' tirwiħ b'kapaċità magħrufa ta' madwar 3 litri ta' ħama attivat u li jkollu separatur (kjarifikatur sekondarju) li jkun jesa madwar 1,5 litri; il-volumi jistgħu, sa ċertu punt, jinbidlu billi jkun aġġustat l-għoli tas-separatur. Reċipjenti ta' daqs differenti jkunu permissibbli jekk jitħaddmu b'pożijiet idrawliċi komparabbli. Jekk ma jkunx possibbli li t-temperatura fil-kamra tat-test tinżamm fil-firxa mixtieqa, huwa rrakkomandat li jintużaw reċipjenti mdawrin bl-ilma b'temperatura kontrollata. Tintuża pompa ta' estrazzjoni bl-arja jew pompa tad-dożar biex tirriċikla l-ħama attivat mis-separatur għar-reċipjent ta' tirwiħ, kontinwament jew kull tant f'intervalli regolari.

21. Is-sistema ta' borma poruża tikkonsisti minn ċilindru fuq ġewwa, poruż b'qiegħ koniku miżmum f'reċipjent ftit akbar tal-istess forma, iżda li jkun magħmul minn materjal tal-plastik li minnu ma jgħaddix l-ilma. Materjal adatt għar-reċipjent poruż huwa l-polietilen poruż b'pori ta' daqs massimu ta' 90 µm u ħoxnin 2 mm. Is-separazzjoni tal-ħama mill-midjum organiku ttrattat issir b'passaġġ differenzjali minn naħa għal oħra tal-ħajt poruż. Effluwenti jinġabru fl-Ispazju annulari minn fejn ifuru għal ġor-reċipjent tal-ġbir. Ma jkun hemm ebda ħama qiegħed u, għalhekk, ma jiġix ħama

▼M4

lura. Is-sistema kollha tista' titrikkeb f'banjumarija kkontrollat termostatikament. Borom poruži jisfaw miżdudin u jistgħu jfuru fl-istadji tal-bidu. F'każ bħal dan, ibdel l-inforra poruża b'waħda nadifa billi l-ewwel tgħaddi minn ġo sifun il-ħama mill-borma għal ġo barmil nadif u tneħħi l-inforra miżduda. Wara li timsaħ sewwa ċ-ċilindru estern li minnu ma jgħaddix l-ilma, daħħal inforra nadifa u erġa' qiegħed il-ħama fil-borma. Xi ħama li jeħel mal-ġnub tal-inforra miżduda jitqaxxar bil-galbu u jittieħed band'oħra. L-ewwel naddaf il-borom miżduda billi tuża ġett irqiq ta' ilma biex tneħħi l-ħama li jkun fadal u billi tgħaddashom f'soluzzjoni dilwita ta' ipoklorit tas-sodju, mbagħad fl-ilma, u wara laħlaħ sewwa bl-ilma.

22. Għal tirwiħ tal-ħama fir-reċipjenti ta' tirwiħ taż-żewġ sistemi, jeħtieġu tekniki adatti, pereżempju kubi sinterizzati (ġebel diffuż) u arja kkompressata. L-arja għandha titnaddaf, jekk ikun meħtieġ, billi tgħaddi minn filtru adatt u tinħasel. Mis-sistema għandha tgħaddi arja suffiċjenti biex jinżammu kondizzjonijiet aerobiċi u biex partiċelli ta' ħama jinżammu f'sospensjoni l-ħin kollu.

Apparat ta' filtrazzjoni jew ċentrifugu

23. Ikun hemm apparat għall-filtrazzjoni ta' kampjuni b'filtri ta' membrani ta' porożità adatta (dijametru ta' apertura nominali ta' 0,45 μm) li jassorbixxu l-kimiċi organiċi li jinħallu u jerħu karbonju organiku fi grad minimu. Jekk jintużaw filtri li jerħu karbonju organiku, aħsel il-filtri sewwa b'ilma sħun biex tneħħi karbonju organiku li jlissi. Alternattivament jista' jintuża ċentrifugu li jkun kapaċi jipproduċi 40 000 m/s^2.

Tagħmir analitiku

24. Apparat meħtieġ biex ikun iddeterminat:

— DOC (karbonju organiku maħlul) u TOC (karbonju organiku totali) jew COD (domanda kimika ta' ossiġnu);

— kimika speċifika, jekk tkun meħtieġa;

— solidi sospiżi, pH, konċentrazzjoni tal-ossiġnu fl-ilma;

— temperatura, aċidità u alkalinità;

— ammonju, nitrit u nitrat, jekk it-test isir f'kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni.

Ilma

25. Ilma tal-vit, li jkun fih anqas minn 3 mg/l DOC. Iddetermina l-alkalinità jekk mhix6magħrufa diġà.

26. Ilma dejonizzat, li jkun fih anqas minn 2 mg/l ta' DOC.

Midjum organiku

27. Dranaġġ sintetiku, dranaġġ domestiku jew taħlita tat-tnejn huma permissibbli bħala l-midjum organiku. Intwera (11)(14) li l-użu ta' dranaġġ domestiku waħdu sikwit jagħti perċentwali miżjud ta' tneħħija ta' DOC u anki jippermetti t-tneħħija u l-bijodegradazzjoni ta' xi kimiċi li ma jkunux iddegradati bijoloġikament meta jintuża dranaġġ sintetiku tal-OECD. Barra dan, il-kostant jew iż-żieda kull tant ta' dranaġġ domestiku sikwit jagħmlu stabbli l-ħama attivat, inkluża l-kapaċità kruċjali li joqgħod sewwa. Għalhekk huwa rrakkomandat l-użu ta' dranaġġ domestiku. Kejjel il-konċentrazzjoni ta' DOC jew ta' COD f'kull lott ġdid ta' midjum organiku. L-aċidità jew l-alkalinità tal-midjum organiku għandha tkun magħrufa. Il-midjum organiku jista' jkun jeħtieġlu li jiżdiedlu lqugħ xieraq (idroġenu karbonat tas-sodju jew fosfat tal-potassju tad-diidroġenu) jekk ikun ta' aċidità jew alkalinità baxxa, biex jinżamm pH ta' madwar 7,5 ± 0,5 fir-reċipjent ta' tirwiħ matul it-test. Kemm ikollu jiżdied ilqugħ, u meta jkollu jiżdied, għandu jkun deċiż għal kull każ għalih waħdu. Meta jintużaw taħlitiet kontinwament jew kull tant, DOC (jew COD) tat-taħlita għandu jinżamm bejn wieħed u ieħor f'valur kostanti, eż. b'dilwizzjoni bl-ilma.

▼M4

Dranaġġ sintetiku

28. Ħoll f'kull litru ta' ilma tal-vit: peptun, 160 mg; estratt tal-laħam, 110 mg; urea, 30 mg; fosfat anidru tal-idroġenu tad-dipotassju (K_2HPO_4), 28 mg; klorur tas-sodju (NaCl), 7 mg; diidrat tal-klorur tal-kalċju ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; ettaidrat tas-sulfat tal-manjeżju (($Mg_2SO_4.7H_20$), 2 mg. Dan id-dranaġġ sintetiku tal-OECD huwa eżempju u jagħti konċentrazzjoni medja tad-DOC fl-influwent ta' madwar 100 mg/l. Alternattivament, uża kompożizzjonijiet oħrajn, b'madwar l-istess konċentrazzjoni tad-DOC, li huma eqreb għall-ħama reali. Jekk ikun meħtieġ influwent inqas konċentrat, iddilwixxi d-dranaġġ sintentiku, pereżempju 1:1 bl-ilma tal-vit biex tikseb konċentrazzjoni ta' maddwar 50 mg/l. Influwent iktar dgħajjef bħal dan se jippermetti tkabbir aħjar tal-organiżmi li jinnitrifikaw u din il-modifika għandha tintuża jekk is-simulazzjoni tal-impjanti tal-ilma mormi li jinnitrifikaw għadnha tiġi investigata. Dan id-dranaġġ sintetiku jista' jsir f'ilma distillat f'forma konċentrata u jinħażen f'madwar 1 °C sa mhux aktar minn ġimgħa. Meta jkun hemm bżonnu, raqqu bl-ilma tal-vit. (Dan il-midjum mhux sodisfaċenti, eż. il-konċentrazzjoni ta' nitroġenu hija għolja ħafna, relattivament b'kontenut ta' karbonju baxx, iżda ma kien issuġġerit xejn aħjar, ħlief li jiżdied aktar fosfat bħala lqugħ u peptun żejjed).

Dranaġġ domestiku

29. Uża dranaġġ qiegħed frisk miġbur kuljum minn xogħlijiet ta' trattament li jirċievu b'mod predominanti dranaġġ domestiku. Dan għandu jinġabar, qabel sedimentazzjoni primarja, mill-kanal tat-tifwir tat-tank ta' sedimentazzjoni primarja, jew mill-għalf għall-impjant tal-ħama attivat, u jkun kważi kollu ħieles minn partiċelli raffi. Id-dranaġġ ikun jista' jintuża wara l-ħżin għal diversi jiem (iżda ġeneralment m'għandhomx jinqabżu sebgħat ijiem) f'madwar 4 °C, jekk ikun ippruvat li DOC (jew COD) ma jkunux naqsu b'mod sinifikanti (jiġifieri b'anqas minn 20 %) matul il-ħżin. Biex ikun illimitat taqlib fis-sistema, DOC (jew COD) ta' kull lott ġdid għandhom ikunu aġġustati qabel ma jintużaw għal valur kostanti xieraq, eż. b'dilwizzjoni bl-ilma tal-vit.

Ħama attivat

30. Iġbor ħama attivat għal tilqim mit-tank ta' tirwiħ ta' impjant imħaddem tajjeb ta' trattament ta' ilma mormi jew mil-laboratorju unità ta' skala ta' ħama attivat, li tittratta l-aktar dranaġġ domestiku.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar

31. Għall-kimiċi li jinħallu b'mod adegwat, ħejji soluzzjonijiet ta' stokkijiet f'konċentrazzjonijiet xierqa (eż. 1 sa 5 g/l) f'ilma dejonizzat, jew fil-porzjon minerali tad-dranaġġ sintetiku. (għall-kimiċi li ma jinħallux u li jkunu volatili, ara l-Appendiċi 5). Iddetermina d-DOC u karbonju organiku totali (TOC) tas-soluzzjoni ta' stokkijiet u tenni l-kejlijiet għal kull lott ġdid. Jekk id-differenza bejn DOC u TOC tkun aktar minn 20 %, ivverifika jekk il-kimika għall-ittestjar tinħallx fl-ilma. Qabbel id-DOC jew il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar imkejla b'analiżi speċifika tas-soluzzjoni ta' stokkijiet mal-valur nominali, biex taċċerta jekk l-irkupru jkunx tajjeb biżżejjed (normalment jista' jkun mistenni li jkun > 90 %). Aċċerta, l-aktar għal tixrid, jekk jistax jintuża DOC jew le bħala parametru analitiku jew jekk tistax tintuża biss teknika analitika b'mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar. Ċentrifugazzjoni tal-kampjuni tkun meħtieġa għal tixrid. Għal kull lott ġdid, kejjel DOC, COD jew il-kimika għall-ittestjar ma' analiżi speċifika.

▼M4

32. Iddetermina pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Valuri estremi jindikaw li żżieda tal-kimika jista' jkollha influwenza fuq pH tal-ħama attivat fis-sistema ta' ttestjar. F'dan il-każ innewtralizza s-soluzzjoni ta' stokkijiet biex tikseb pH ta' 7 ± 0,5 b'ammonti żgħar ta' aċidu jew bażi inorganiċi, iżda evita l-preċipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

PROĊEDURA

33. Il-proċedura hija deskritta għall-unitajiet ta' impjanti ta' ħama attivat; għandha tkun adattata xi ftit għas-sistema tal-borma poruża.

Tħejjija tat-tilqima

34. Laqqam is-sistema ta' ttestjar fil-bidu tat-test bil-ħama attivat jew b'tilqima li jkun fiha konċentrazzjoni baxxa ta' mikroorganiżmi. Żomm it-tilqima mrewħa f'temperatura ambjentali sakemm tintuża u użaha f'ħin ta' 24 siegħa. Fl-ewwel każ, ħu kampjun ta' ħama attivat mit-tank ta' tirwiħ ta' impjant bijoloġiku mħaddem b'mod effiċjenti ta' trattament ta' ilma mormi, jew ta' impjant laboratorju ta' trattament, li jirċievi b'mod predominanti dranaġġ domestiku. Jekk kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni jkollhom ikunu ssimulati, ħu ħama minn impjant ta' nitrifikazzjoni ta' trattament ta' ilma mormi. Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi u, jekk ikun meħtieġ, ikkonċentra l-ħama billi tħallieh joqgħod biex il-volum miżjud mas-sistema ta' ttestjar ikun minimu. Żgura li konċentrazzjoni tal-bidu ta' materja niexfa tkun madwar 2,5 g/l.

35. Fit-tieni każ, uża 2 ml/l sa 10 ml/l ta' effluwent minn impjant bijoloġiku domestiku ta' trattament ta' ilma mormi bħala tilqima. Biex tieħu kemm jista' jkun ħafna speċijiet differenti ta' batterja, jista' jkun ta' għajnuna jekk iżżid tilqimiet minn diversi sorsi oħra, pereżempju ilma tal-wiċċ. F'dan il-każ, il-ħama attivat għandu jiżviluppa u jikber fis-sistema ta' ttestjar.

Dożaġġ ta' midjum organiku

36. Żgura li kontenituri ta' influwenti u effluwenti u tubi minn reċipjenti ta' influwenti u għal reċipjenti ta' effluwenti jitnaddfu sewwa biex tneħħi tkabbir mikrobiku fil-bidu u matul it-test kollu. Iġbor flimkien is-sistemi ta' ttestjar f'kamra fejn it-temperatura tkun ikkontrollata (normalment fil-firxa ta' 20-25 C) jew uża unitajiet ta' ttestjar imdawrin bl-ilma. Ħejji volum suffiċjenti tal-midjum organiku meħtieġ (paragrafi 27-29). Fil-bidu imla r-reċipjent ta' tirwiħ u s-separatur bil-midjum organiku u żid it-tilqima (paragrafi 34, 35). Ibda t-tirwiħ b'mod li l-ħama jinżamm f'sospensjoni u fi stat aerobiku u ibda ddoża l-influwent u rriċikla l-ħama qiegħed. Iddoża l-midjum organiku barra mir-reċipjenti ta' ħżin għal ġor-reċipjenti ta' tirwiħ (paragrafi 20, 21) tat-test u kkontrolla unitajiet u iġbor l-effluwenti rispettivi f'reċipjenti simili ta' ħżin. Biex iġġib il-ħin normali ta' ritenzjoni idrawlika ta' 6h, il-midjum organiku jiġi ppumpjat f'0,5 l/h. Biex tikkonferma din ir-rata, kejjel l-ammont ta' kuljum tal-midjum organiku ddożat billi tieħu nota tat-tnaqqis fil-volumi tal-midjum fil-kontenituri tal-ħżin. Modalitajiet oħra ta' dożar ikunu meħtieġa biex ikunu ddeterminati l-effetti ta' meta jkun hemm reħi kull tant u tagħbija "ħasda" tal-kimiċi.

37. Jekk il-midjum organiku jitħejja biex jintuża għal perjodu itwal minn jum wieħed (1), ikunu meħtieġa tkessiħ f'madwar 4 °C jew metodi oħra adatti ta' konservazzjoni biex ma jitħalliex ikun hemm tkabbir mikrobiku u bijodegradazzjoni 'l barra mill-unitàjiet ta' ttestjar (paragrafu 29). Jekk jintuża dranaġġ sintetiku, ikun possibbli titħejja, u tinħażen f'madwar 4 °C, soluzzjoni konċentrata ta' stokkijiet (eż. 10 darbiet il-konċentrazzjoni normali, paragrafu 28). Din is-soluzzjoni ta' stokkijiet tista' titħallat sewwa mal-volum adatt ta' ilma tal-vit qabel ma tintuża; alternattivament, tista' tkun ippumpjata direttament waqt li l-ammont adatt ta' ilma tal-vit ikun ippumpjat separatament.

▼M4

Dożaġġ tal-kimika għall-ittestjar

38. Żid volum adatt tas-soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar (paragrafu 31) fir-reċipjent ta' ħżin tal-influwent jew iddożah direttament b'pompa separata għal ġor-reċipjent ta' tirwiħ. Il-konċentrazzjoni medja normali tal-ittestjar fl-influwent għandha tkun bejn10 mg/l u 20 mg/l DOC, bil-konċentrazzjoni ta' fuq ta' mhux iktar minn 50 mg/l. Jekk is-solubilità fl-ilma tal-kimika għall-ittestjar tkun baxxa jew jekk aktarx iseħħu effetti tossiċi, naqqas il-konċentrazzjoni għal 5 mg/l DOC jew anki anqas, iżda biss jekk ikun hemm u jitwettaq metodu analitiku speċifiku adatt (jistgħu jiżdiedu l-kimiċi għall-ittestjar imxerrdin li ftit jinħallu fl-ilma billi jintużaw tekniki speċjali ta' dożar, ara l-Appendiċi 5).

39. Ibda żid il-kimika għall-ittestjar wara perjodu li fih is-sistema tkun saret stabbli u tkun qed tneħħi DOC tal-midjum organiku b'mod effiċjenti (madwar 80 %). Huwa importanti li tara li l-unitajiet kollha jkunu qed jaħdmu l-istess b'mod effiċjenti qabel ma tiżdied kimika għall-ittestjar; jekk ma jkunux, is-soltu jkun ta' għajnuna li ħama jitħallat ma' ieħor u li jerġgħu jitqassmu volumi ndaqs lil unitajiet individwali. Meta tintuża tilqima ta' (madwar) 2,5 g/l (piż fin-niexef) ta' ħama attivat, il-kimika għall-ittestjar tista' tiżdied mill-bidu tat-test minħabba li żieda diretta ta' aktar ammonti mill-bidu għandha l-vantaġġ li l-ħama attivat ikun jista' jadatta aħjar għall-kimika għall-ittestjar. Ikun x'ikun il-mod li bih il-kimika għall-ittestjar tiżdied, huwa rrakkomandat li r-rata rilevanti ta' fluss u/jew il-volumi fir-reċipjent(i) ta' ħżin jitkejlu f'intervalli regolari.

Maniġġar ta' ħama attivat

40. Il-konċentrazzjoni ta' solidi ta' ħama attivat normalment issir stabbli bejn limiti matul it-test, b'mod indipendenti mit-tilqima użata, fil-firxa ta' 1 sa 3 g/l (piż fin-niexef) skont il-kwalità u l-konċentrazzjoni tal-midjum organiku, kondizzjonijiet operazzjonali, in-natura tal-mikroorganiżmi li jkun hemm u l-influwenza tal-kimika għall-ittestjar.

41. Iddetermina s-solidi sospiżi fir-reċipjenti ta' tirwiħ għall-anqas darba fil-ġimgħa u warrab ħama żejjed biex iżżomm il-konċentrazzjoni f'1 g/l sa 3 g/l (piż fin-niexef), jew ikkontrolla kemm, bħala medja, ikollha żmien il-ħama, f'valur kostanti, is-soltu fil-firxa ta' 6 ijiem sa 10 ijiem. Jekk, pereżempju, jingħażel żmien ta' retenzjoni ta' ħama ta' 8 ijiem, neħħi kuljum 1/8 tal-volum tal-ħama attivat fir-reċipjent ta' tirwiħ u warrbu. Agħmel dan kuljum jew, aħjar, permezz ta' pompa taħdem awtomatikament minn ħin għal ieħor. Iż-żamma tal-konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi b'mod kostanti, jew f'limiti stretti, ma żżommx żmien kostanti ta' retenzjoni ta' ħama (SRT), li huwa l-varjabbli operazzjonali li jiddetermina l-valur tal-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fl-effluwent.

42. Matul it-test kollu, neħħi, mill-anqas kuljum, kull ħama li jeħel mal-ħitan tar-reċipjent ta' tirwiħ u mas-separatur biex jerġa' jkun sospiż. Ikkontrolla u naddaf regolarment it-tubi kollha u s-sistema tat-tubi biex ma tħallix tikber bijorita. Irriċikla l-ħama li jkun qagħad mis-separatur għal ġor-reċipjent ta' tirwiħ, preferibbilment b'ippumpjar kull tant ħin. Ebda riċiklar ma jsir fis-sistema ta' borma poruża iżda żgura li borom ta' ġewwa jiddaħħlu nodfa qabel ma l-volum fir-reċipjent jogħla b'mod sinifikanti (paragrafu 21).

43. Jista' jkun hemm ħama li ma joqgħodx tajjeb u telf ta' ħama fl-unitajiet ta' impjanti Husmann. Dan jista' jissewwa billi ssir azzjoni waħda jew aktar, elenkati hawn taħt, fl-istess waqt tat-test u tal-unitajiet ta' kontroll:

— ħama friska jew flocculi (pereżempju 2 ml/reċipjent ta' 50 g/l $FeCl_3$) jistgħu jiżdiedu f'intervalli regolari, eż. kull ġimgħa, iżda aċċerta li ma jseħħu ebda reazzjoni jew preċipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ma' $FeCl_3$;

▼M4

— il-pompa ta’ estrazzjoni bl-arja tista’ tiġi sostitwita b’pompa peristaltika, biex b’ħekk ikun jista’ jkun ħemm fluss ta’ ċirkulazzjoni mill-ġdid ta’ ħama li jkun kważi daqs il-fluss tal-influwent li jkollu jintuża u li jippermetti żvilupp ta’ żona anaerobika fil-ħama qiegħed (il-ġeometrija tal-pompa ta’ estrazzjoni bl-arja tillimita r-rata minima ta’ fluss ta’ ħama li jkun mar lura għal madwar 12-il darba ta’ dik tal-influwent);

— ħama jista’ jiġi ppumpjat minn ħin għal ieħor mis-separatur għal ġor-reċipjent ta’ tirwiħ (eż. kull 5 min. kull 2,5 h biex ikun irriċiklat 1 l/h to 1,5 l/h;

— jista’ jintuża aġent mhux tossiku, kontra r-ragħwa f’konċentrazzjoni minima biex ma jitħalliex ikun hemm telf minħabba r-ragħwa (eż. żejt tas-silikon);

— l-arja tista’ tiġi mgħoddija mill-ħama fis-separatur bi skossi qosra, mfaqqa’ (eż. 10 sek. kull siegħa);

— il-midjum organiku jista’ jiġi ddoċat f’intervalli fir-reċipjent ta’ tirwiħ (eż. 3 minuti sa 10 minuti kull siegħa).

Teħid ta’ kampjuni u analiżi

44. F’intervalli regolari kejjel il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul, it-temperatura u l-valur pH tal-ħama attivat fir-reċipjenti ta’ tirwiħ. Żgura li dejjem ikun hemm ossiġnu biżżejjed (> 2 mg/l) u li t-temperatura tinżamm fil-firxa meħtieġa (normalment 20 °C sa 25 °C). Żomm il-pH f’7,5 ± 0,5 billi tiddoża ammonti żgħar ta’ bażi inorganiku jew aċidu fir-reċipjent ta’ tirwiħ jew fl-influwent, jew billi żżid il-kapaċità ta’ lqugħ tal-midjum organiku (ara l-paragrafu 27). Meta jkun hemm nitrifikazzjoni jkun prodott l-aċidu, bl-ossidazzjoni ta’ 1 mg N tipproduċi l-ekwivalenti ta’ madwar 7 mg CO_3. Kemm il-kejlijiet ikun ta’ spiss jiddependi mill-parametru li jkollu jitkejjel u mill-istabbiltà tas-sistema, u jista’ jvarja bejn kejl kuljum u kejl kull ġimgħa.

45. Kejjel DOC jew COD fl-influwenti għar-reċipjenti ta’ kontroll u ttestjar. Kejjel il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-influwent tat-test b’analiżi speċifika jew stmaha mill-konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ta’ stok-kijiet (paragrafu 31), mill-volum użat u mill-ammont ta’ dranaġġ iddożat għal ġol-unità ta’ ttestjar. Huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar tkun ikkalkulata biex titnaqqas il-varjabbiltà tad-dejta tal-konċentrazzjoni.

46. Ħu kampjuni adatti mill-effluwent miġbur (eż. komposti ta’ 24 h) u ffiltra minn ġo membrana b’pori ta’ daqs ta’ 0,45 μm jew agħmel ċentrifugu minnhom f’madwar 40,000 m/s^2 għal madwar 15-il min. Centrifugu għandu jsir jekk il-filtrazzjoni tkun diffiċli. Iddetermina DOC jew COD mill-anqas b’mod duplikat biex tkejjel il-bijodegradazzjoni finali u, jekk tkun meħtieġa, il-bijodegradazzjoni primarja b’analiżi b’mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar.

47. L-użu ta’ COD jista’ jġib miegħu problemi analitiċi f’konċentrazzjonijiet baxxi u, għalhekk, huwa rrakkomandat biss jekk tintuża konċentrazzjoni tat-test li tkun għolja biżżejjed (madwar 30 mg/l). Barra dan, għall-kimiċi li jassorbu ħafna, huwa rrakkomandat li l-ammont ta’ kimika assorbita fil-ħama titkejjel billi tintuża teknika analitika b’mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar.

48. Il-frekwenza ta’ teħid ta’ kampjuni tiddependi minn kemm ikun mistenni jdum it-test. Frekwenza rakkomandata tkun ta’ tliet darbiet fil-ġimgħa. Malli l-unitajiet ikunu qed jaħdmu b’mod effiċjenti, ħalli minn ġimgħa sa mhux aktar minn 6 ġimgħat wara li l-kimika għall-ittestjar tkun iddaħħlet, biex din tadatta u tilħaq stat regolari. Preferibbilment ikseb mill-anqas 15-il valur validu fil-faži ta’ livell kostanti (paragrafu 59), li normalment iddum 3 ġimgħat, għall-evalwazzjoni tar-riżultat tat-test. It-test jista’ jitlesta jekk jintlaħaq grad suffiċjenti ta’ eliminazzjoni (eż. > 90 %) u jkunu disponibbli dawn il-15-il valur, li jirrappreżentaw analiżi magħmula kull jum tal-ġimgħa tul 3 ġimgħat. Normalment taqbiżx durata ta’ test ta’ aktar minn 12-il ġimgħa wara li tkun żdiedet il-kimika għall-ittestjar.

▼M4

49. Jekk il-ħama jinbidel f'nitrat jew f'nitritu u jekk l-effetti tal-kimika għall-ittestjar fuq in-nitrifikazzjoni jkollhom ikunu studjati, analizza kampjuni mill-effluwent tat-unitajiet ta' ttestjar u ta' kontroll mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ammonju u/jew nitrit flimkien ma' nitrat.

50. L-analiżi kollha għandha ssir malajr kemm jista' jkun, l-aktar id-determinazzjonijiet tan-nitroġenu. Jekk analiżi jkollha tiġi posposta, aħżen il-kampjuni f'madwar 4 °C fid-dlam fi fliexken mimlijin u magħluqin issikkati. Jekk kampjuni jkollhom jinħażnu għal aktar minn 48 siegħa, ippreservahom fil-friża, b'aċidifikazzjoni (eż. 10 ml/l ta' soluzzjoni ta' 400 g/l ta' aċidu sulfuriku) jew biż-żieda ta' kimika tossika adatta (eż. 20 ml/l ta' soluzzjoni ta' 10 g/l ta' klorur tal-merkurju (II)). Żgura li t-teknika ta' preservazzjoni ma tinfluwenzax riżultati ta' analiżi.

Akkoppjar ta' unitajiet ta' ttestjar

51. Jekk ikollu jintuża akkoppjar (Appendiċi 3), ibdel kuljum l-istess ammont ta' ħama attivat (150 ml sa 1 500 ml għal reċipjenti ta' tirwiħ li jkun fihom 3 litri ta' likwidu) bejn ir-reċipjenti ta' tirwiħ tal-unità ta' ttestjar u l-unità ta' kontroll tagħha. Jekk il-kimika għall-ittestjar tassorbixxi ħafna mill-ħama, ibdel biss is-supernatant tas-separaturi. Fiż-żewġ każijiet uża fattur ta' korrezzjoni biex tikkalkula r-riżultat tat-test (paragrafu 55).

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

52. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD tal-kimika għall-ittestjar għal kull valutazzjoni li jkun itteħdilha l-ħin, billi tuża l-ekwazzjoni:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

fejn

D_t = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD f'ħin t

C_s = DOC jew COD fl-influwent minħabba l-kimika għall-ittestjar, preferibbilment stmat mis-soluzzjoni ta' stokkijiet (mg/l)

E = valur imkejjel ta' DOC jew COD fl-effluwent tat-test f'ħin t (mg/l)

E_o = valur imkejjel ta' DOC jew COD fl-effluwent tal-kontroll f'ħin t (mg/l)

53. Il-grad ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll ikun ta' informazzjoni utli biex tkun ivvalutata l-attività bijodegradattiva tal-ħama attivat matul it-test. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni bl-ekwazzjoni:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

fejn

D_B = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll f'ħin t

C_M = DOC jew COD tal-midjum organiku fl-influwent tal-kontroll (mg/l)

▼M4

B’mod fakultattiv, ikkalkula l-perċentwali ta’ eliminazzjoni DOC jew COD minħabba l-midjum organiku flimkien ma’ kimika għall-ittestjar fl-unità ta’ ttestjar bl-ekwazzjoni:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

fejn

D_T = % ta’ eliminazzjoni ta’ influwent totali tat-test DOC jew COD

C_T = DOC jew COD ta’ influwent totali tat-test jew ikkalkulat mis-soluzzjonijiet ta’ stokkijiet (mg/l)

54. Ikkalkula t-tneħħija tal-kimika għall-ittestjar jekk din titkejjel b’metodu analitiku speċifiku f’valutazzjoni ta’ kull darba bl-ekwazzjoni:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

fejn

D_{ST} = % ta’ eliminazzjoni primarja ta’ kimika għall-ittestjar f’ħin t

S_i = konċentrazzjoni mkejla jew stmata tal-kimika għall-ittestjar fl-influwent tat-test (mg/l)

S_e = konċentrazzjoni mkejla tal-kimika għall-ittestjar f’effluwent ta’ test f’ħin t (mg/l)

55. Jekk tkun ntużat il-modalità ta’ akkoppjar, ikkumpensa d-dilwizzjoni tal-kimika għall-ittestjar fir-reċipjent ta’ tirwiħ bl-iskambju ta’ ħama billi tuża fattur ta’ korrezzjoni (ara l-Appendiċi 3). Jekk ikunu ġew użati ħin medju ta’ retenzjoni idrawlika ta’ 6 sigħat u skambju ta’ nofs il-volum tal-ħama attivat fir-reċipjent ta’ tirwiħ, il-valuri determinati ta’ eliminazzjoni kuljum (D_t, paragrafu 52) ikollhom ikunu kkoreġuti biex jinkiseb il-grad veru ta’ eliminazzjoni, Dtc, tal-kimika għall-ittestjar bl-ekwazzjoni:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Espressjoni ta’ riżultati tat-testijiet

56. Immarka l-perċentwali ta’ eliminazzjoni D_t (jew D_{tc}) u D_{st}, jekk ikunu disponibbli, kontra l-ħin (ara l-Appendiċi 2). Mill-forma tal-kurva ta’ eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (per se jew bħala DOC) jistgħu jinstiltu xi konklużjonijiet dwar il-proċess ta’ tneħħija.

Sorbiment

57. Jekk tkun osservata eliminazzjoni għolja ta’ DOC tal-kimika għall-ittestjar mill-bidu tat-test, il-kimika għall-ittestjar tkun probabbilment eliminata b’sorbiment fis-solidi ta’ ħama attivat. Ikun possibbli li dan ikun ippruvat billi tkun iddeterminata l-kimika għall-ittestjar assorbita b’analiżi speċifika. Mhux is-soltu li l-eliminazzjoni ta’ DOC tal-kimiċi li jistgħu jkunu assorbiti tibqa’ għolja matul it-test kollu; normalment ikun hemm grad għoli ta’ tneħħija fil-bidu li bil-mod il-mod jinżel għal valur ta’ ekwilibriju. Jekk, iżda, il-kimika għall-ittestjar li tista’ tkun assorbita, setgħet ikkawżat akklimatazzjoni tal-massa mikrobika b’xi mod jew ieħor, l-eliminazzjoni ta’ DOC tal-kimika għall-ittestjar wara tiżdied u tilħaq valur livell kostanti għoli.

▼M4

Fażi ta' intervalli

58. Bħal f'testijiet statiċi, ta' tgħarbil, ħafna kimiċi għall-ittestjar jeħtieġu fażi ta' intervalli qabel ma sseħħ bijodegradazzjoni sħiħa. Fil-fażi ta' intervalli, isseħħ akklimatazzjoni jew adattament tal-batterja li tkun qed tiddegrada mingħajr ma kważi titneħħa l-kimika għall-ittestjar; mbagħad iseħħ it-tkabbir tal-bidu ta' dawn il-batterji. Din il-fażi tintemm u l-fażi ta' degradazzjoni titqies li tkun bdiet meta jitneħħa madwar 10 % tal-ammont tal-bidu ta' kimika għall-ittestjar (wara li jkun tqies is-sorbiment, jekk iseħħ). Il-fażi ta' intervalli sikwit tkun varjabbli ħafna u bilkemm riproduċibbli.

Fażi ta' livell kostanti

59. Il-fażi ta' livell kostanti ta' kurva ta' eliminazzjoni f'test kontinwu hija ddefinita bħala dik il-fażi li fiha sseħħ id-degradazzjoni massima. Il-fażi ta' livell kostanti għandha tkun mill-anqas ta' 3 ġimgħat u jkollha madwar 15-il valur validu mkejjel.

Grad medju ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar

60. Ikkalkula l-valur medju mill-valuri ta' eliminazzjoni (D_t) tal-kimika għall-ittestjar fil-fażi ta' livell kostanti. Miġjub għad-dritt sal-eqreb numru sħiħ (1 %), dan ikun il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Huwa wkoll irrakkomandat li jkun ikkalkulat l-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-valur medju.

Eliminazzjoni ta' midjum organiku

61. Immarka l-perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC jew ta' COD tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll (D_B) kontra l-ħin. Indika l-grad medju ta' eliminazzjoni bl-istess mod bħal tal-kimika għall-ittestjar (paragrafu 60).

Indikazzjoni ta' bijodegradazzjoni

62. Jekk il-kimika għall-ittestjar ma tassorbix b'mod sinifikanti l-ħama attivat, u l-kurva ta' eliminazzjoni jkollha forma tipika ta' kurva ta' bijodegradazzjoni b'intervall, fażijiet ta' degradazzjoni u livell kostanti (paragrafi 58, 59), l-eliminazzjoni mkejla tista' kważi fiċ-ċert tkun attribwita lill-bijodegradazzjoni. Jekk tkun seħħet tneħħija inizjali għolja, it-test ta' simulazzjoni ma jkunx jista' jiddivrenzja bejn proċessi ta' eliminazzjoni bijoloġiċi u abijotiċi. F'każijiet bħal dawn, u f'każijiet oħra meta jkun hemm xi dubju dwar il-bijodegradazzjoni (eż. jekk isir stripaġġ), analizza l-kimiċi għall-ittestjar assorbiti jew agħmel testijiet statiċi addizzjonali ta' bijodegradazzjoni ibbażati fuq parametri li jindikaw b'mod ċar proċessi bijoloġiċi. Testijiet bħal dawn huma l-metodi ta' konsum ta' ossiġnu (il-Kapitolu C.4 D, E u F ta' dan l-Anness (6)) jew test b'kejl ta' produzzjoni ta' diossidu tal-karbonju (il-Kapitolu C.4 C ta' dan l-Anness (6)) jew il-metodu ta' Spazju Fuq ta' ISO (18), billi tintuża tilqima esposta minn qabel mit-test ta' simulazzjoni. Jekk kemm it-tneħħija ta' DOC, kif ukoll it-tneħħija ta' kimika speċifika jkunu tkejlu, differenzi sinifikanti (tal-ewwel ikunu anqas minn tal-aħħar) bejn il-perċentwali mneħħija jindikaw li kien hemm fl-effluwenti prodotti organiċi intermedji li jistgħu jkunu aktar diffiċli li jiddegradaw milli l-kimika prinċipali.

Validità ta' riżultati tat-testijiet

63. Informazzjoni dwar imġiba normali ta' bijodegradazzjoni tat-tilqima tinkiseb jekk ikun iddeterminat il-grad ta' eliminazzjoni tal-midjum organiku (paragrafu 53) fl-unità ta' kontroll. Qis it-test bħala validu jekk il-grad ta' eliminazzjoni ta' DOC jew ta' COD fl-unità/unitajiet ta' kontroll ikun > 80 % wara ġimagħtejn u ma tkun saret ebda osservazzjoni mhux tas-soltu.

▼M4

64. Jekk tkun intużat kimika (ta' referenza) bijodegradabbli faċilment, il-grad ta' bijodegradazzjoni (D_t, paragrafu 52) għandu jkun > 90 %.

65. Jekk it-test isir f'kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni, il-konċentrazzjoni medja fl-effluwenti għandha tkun < 1 mg/l ammonja-N u < 2 mg/l nitrit-N.

66. Jekk dawn il-kriterji (paragrafi 63-65) ma jitħarsux, tenni t-test billi tuża tilqima minn sors differenti, ittestja kimika ta' referenza, u eżamina mill-ġdid il-proċeduri kollha sperimentali.

Rapport tat-test

67. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Kimika għall-ittestjar:

— dejta ta' identifikazzjoni;

— natura fiżika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi.

Kondizzjonijiet tat-test:

— tip ta' sistema ta' ttestjar; kull modifika għall-ittestjar tal-kimiċi li ma jinħallux u jkunu volatili;

— tip ta' midjum organiku;

— proporzjon u natura ta' ilmijiet industrijali mormija fid-dranaġġ, jekk ikunu magħrufa;

— tilqima, natura u sit(i) ta' teħid ta' kampjuni, konċentrazzjoni u kull trattament minn qabel;

— soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimiċi għall-ittestjar: kontenut ta' DOC u ta' TOC; kif titħejja, jekk ta' sospensjoni; konċentrazzjoni tat-test użata; raġunijiet jekk ikunu 'l barra mill-firxa ta' 10 - 20 mg/l DOC; metodu ta' żieda; data tal-ewwel żieda; kull bidla;

— kemm, bħala medja, ikollha żmien il-ħama u ħin medju ta' retenzjoni idrawlika; metodu ta' rimi ta' ħama; metodi li jegħlbu l-kwantitajiet, telf ta' ħama, eċċ.;

— tekniċi analitiċi użati;

— temperatura tat-test;

— kwalitajiet tal-kwantitajiet ta' ħama, indiċi ta' volumi ta' ħama (SVI), solidi sospiżi ta' likwidu mħallat (MLSS);

— kull devjazzjoni minn proċeduri standard u kull ċirkostanza li setgħet affettwat riżultati.

Riżultati tat-testijiet:

— dejta mkejla kollha (DOC, COD, analiżi speċifika, pH, temperatura, konċentrazzjoni tal-ossiġnu, solidi sospiżi, l-kimiċi N, jekk rilevanti;

— il-valuri kollha kkalkolati ta' D_t (jew D_{tc}), D_B, D_{St} miksuba f'forma tabulari u l-kurvi ta' eliminazzjoni;

— informazzjoni dwar fażijiet ta' intervalli u ta' livelli kostanti, durata ta' testijiet, il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar u dak tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll, flimkien ma' informazzjoni dwar statistika u dikjarazzjonijiet dwar il-bijodegradabbiltà u l-validità tat-test;

— diskussjoni dwar ir-riżultati.

▼**M4**

LETTERATURA:

(1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Chapter C.4 of this Annex, Determination of 'Ready' Biodegradability.

(7) Chapter C.12 of this Annex, Biodegradation - Modified SCAS Test.

(8) Chapter C.19 of this Annex, Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{OC}) on Soil and on Sewage Sludge Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK u Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

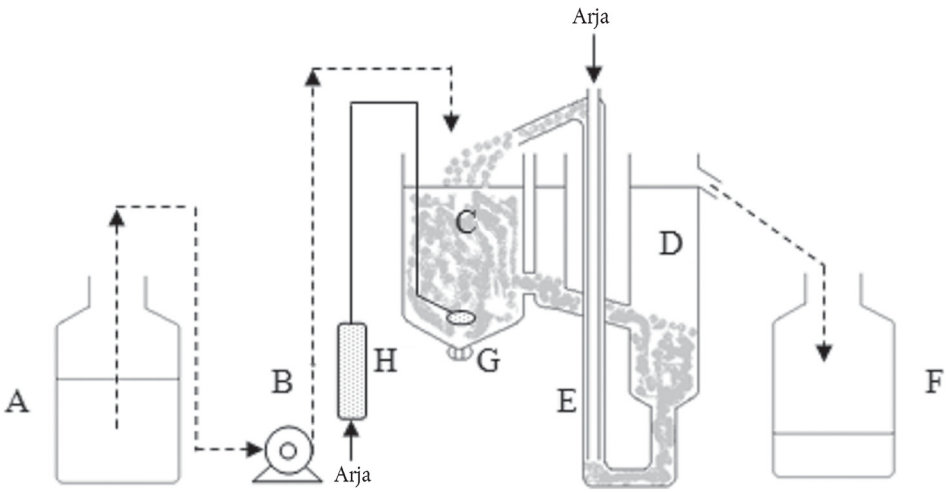
▼**M4**

Appendiċi 1

Figura 1

Tagħmir użat għall-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà

Unità Husmann



A. Reċipjent ta' ħżin

B. Pompa tad-dożar

C. Kompartiment ta' tirwiħ (3 l kapaċità)

D. Reċipjent ta' sediment

E. Pompa ta' estrazzjoni bl-arja

F. Reċipjent ta' ġbir

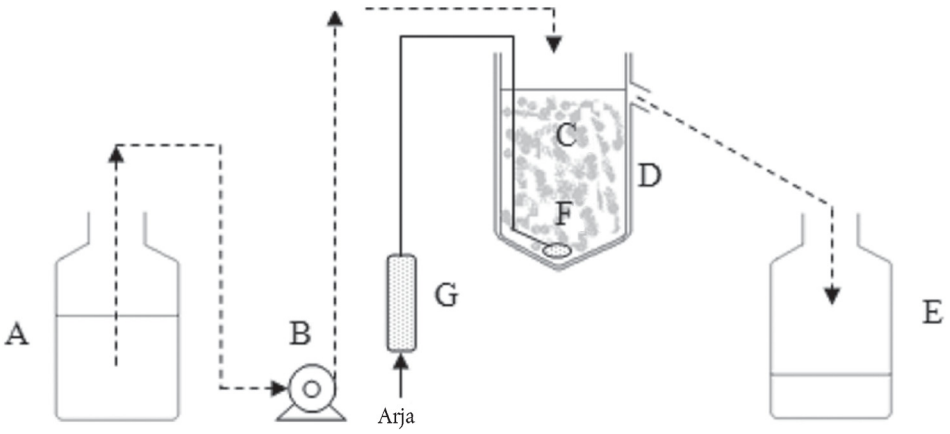
G. Rewwieħ

H. Miter ta' fluss ta' arja

Figura 2

Tagħmir użat għall-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà

Borma poruża



A. Reċipjent ta' ħżin

B. Pompa tad-dożar

C. Borma poruża ta' tirwiħ

D. Reċipjent ta' barra impermeabbli

E. Reċipjent ta' ġbir

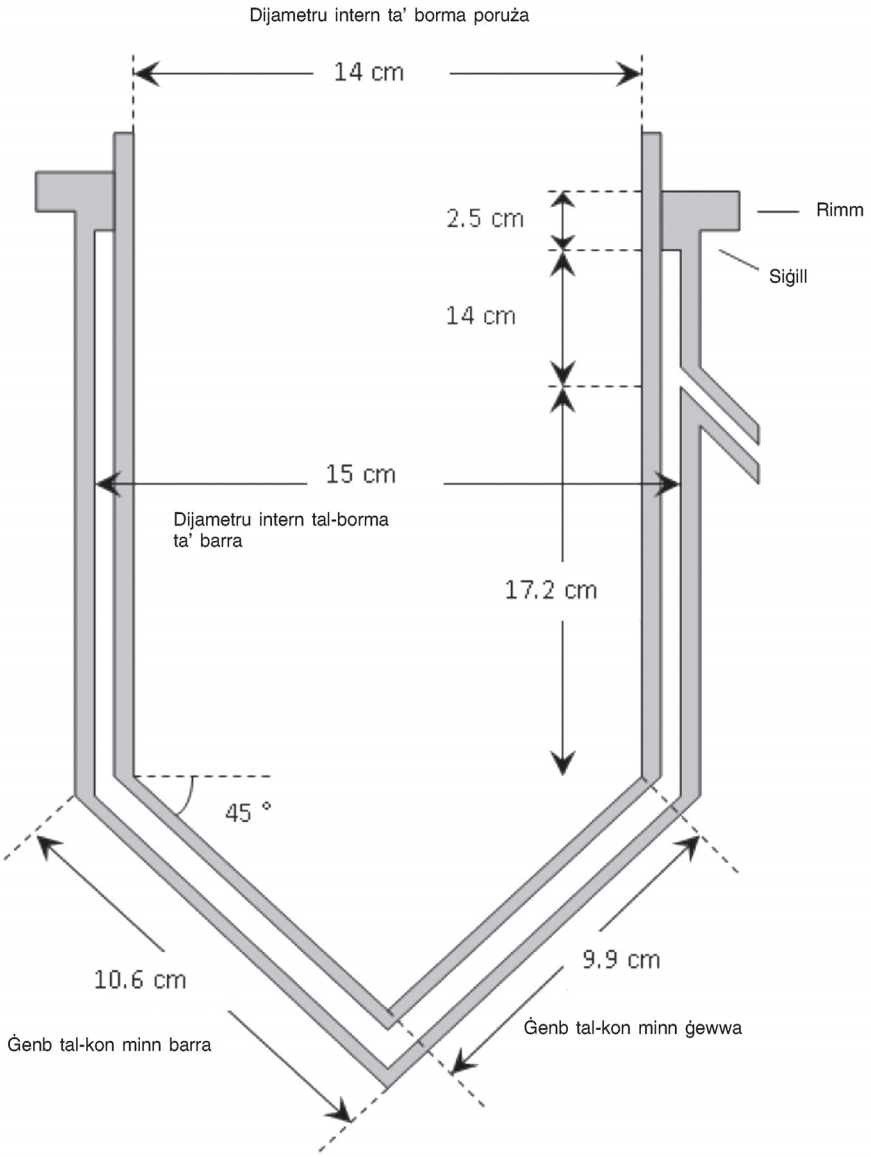
F. Diffużur

G. Miter ta' fluss ta' arja

▼**M4**

Figura 3

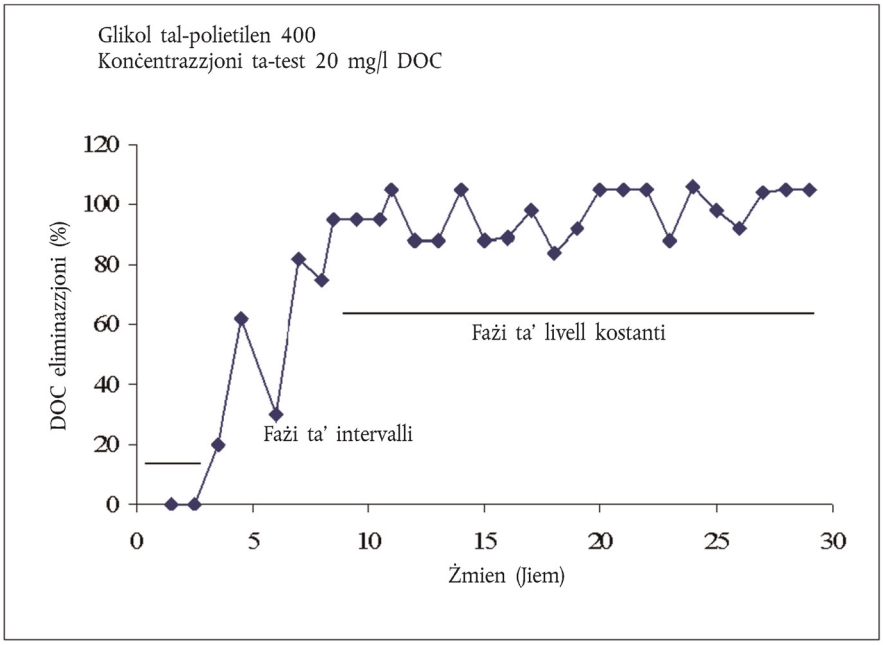
Dettalji ta' reċipjent ta' tirwiħ ta' borma poruża ta' 3 litri



▼**M4**

Appendiċi 2

Eżempju ta' kurva ta' eliminazzjoni



▼**M4**

Appendiċi 3

[INFORMATTIV]

AKKOPPJAR TAL-UNITAJIET TA' TTESTJAR

Għall-tentattiv biex il-mases mikrobiċi jkunu ndaqs f'ħama f'unità ta' ttestjar, li tirċievi dranaġġ flimkien ma' kimika għall-ittestjar, u f'unità ta' kontroll, li tirċievi dranaġġ biss, kien introdott skambju ta' ħama kuljum (1). Il-proċedura ssejħet akkoppjar u l-metodu huwa magħruf bħala unitajiet akkoppjati. L-akkoppjar għall-bidu kien isir billi kienu jintużaw unitajiet Husmann ta' ħama attivat, iżda kien isir ukoll b'unitajiet ta' Borma Poruża (2)(3). Ma kienu nstabu ebda differenzi sinifikanti f'riżultati ta' bejn unitajiet mhux akkoppjati u akkoppjati, kemm jekk ta' Husmann jew ta' Borma Poruża, għalhekk m'hemm ebda vantaġġ f'ħela' ta' żmien u enerġija meħtieġa biex unitajiet ikunu akkoppjati.

Skambju ta' ħama jista' jagħti dehra ta' tneħħija tassew konsiderevoli, minħabba li xi ftit mil-kimika għall-ittestjar tiġi ttrasferita u l-konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar fl-effluwenti ta' test u kontroll isiru aktar kważi ndaqs. Għalhekk ikollhom jintużaw fatturi korrettivi, li jkunu jiddependu mill-frazzjoni skambjata u mill-ħin medju ta' retenzjoni idrawlika. Kienu ppubblikati aktar dettalji tal-kalkulazzjoni (1).

Ikkalkula l-grad ta' eliminazzjoni kkoreġuta ta' DOC jew COD billi tuża l-formula ġenerali:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

fejn

D_{tc} = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD ikkoreġut

D_t = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD determinat

a = frazzjoni ta' skambju tal-volum tal-unitajiet ta' ħama attivat

r = ħin medju ta' retenzjoni idrawlika (h)

Jekk, pereżempju, nofs il-volum tat-tank ta' tirwiħ ikun skambjat (a = 0,5) u l-ħin medju ta' retenzjoni idrawlika jkun 6 h, il-formula ta' korrezzjoni tkuna:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LETTERATURA:

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Appendiċi 4

EVALWAZZJONI TA' INIBIZZJONI TAL-ĦAMA ATTIVAT

Proċess b'kimiċi għall-ittestjar

1. Kimika (jew ilma mormi) tista' ma tkunx iddegradata jew imneħħija fit-test ta' simulazzjoni u jista' wkoll ikollha effett inibitorju fuq il-mikroorganiżmi tal-ħama. Kimiċi oħra jkunu ddegradati bijoloġikament f'konċentrazzjonijiet baxxi iżda jkunu inibitorji f'konċentrazzjoni ogħla (ormesi). Effetti inibitorji setgħu kienu ġew żvelati fi stadju aktar bikri jew jistgħu jkunu ddeterminati bl-applikazzjoni ta' test tat-tossiċità, bl-użu ta' tilqima simili jew identika għal dik użata fit-test ta' simulazzjoni (1). Metodi bħal dawn jinibixxu konsum ta' ossiġnu (il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness (2) u ISO 8192(3)) jew inibizzjoni għal tkabbir ta' organiżmi tal-ħama (ISO 15522 (4)).

2. Fit-test ta' simulazzjoni kull inibizzjoni tkun tidher mid-differenza ta' karbonju organiku maħlul (DOC) jew mid-domanda kimika ta' ossiġnu (COD) bejn l-effluwent mir-reċipjent tat-test u dak mill-kontroll li jkun akbar minn DOC miżjud bħala kimika għall-ittestjar. Espress mod ieħor, il-perċentwali ta' tneħħija ta' DOC (u domanda biokimika ta' ossiġnu (BOD), domanda kimika ta' ossiġnu (COD), u/jew NH^{+}_{4}) tal-midjum organiku dwar trattament għandu jitnaqqas meta jkun hemm il-kimika għall-ittestjar. Jekk dan iseħħ, it-test għandu jittenna billi titnaqqas il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar sakemm jintlaħaq livell li fih ma sseħħ ebda inibizzjoni u forsi titnaqqas aktar il-konċentrazzjoni sakemm il-kimika għall-ittestjar tkun iddegradata bijoloġikament. Iżda jekk il-kimika għall-ittestjar (jew ilma mormi) ikollhom effetti ħżiena fuq il-proċess fil-konċentrazzjonijiet kollha ttestjati, l-indikazzjonijiet ikunu li l-kimika tkun diffiċli, jekk mhux impossibbli, li tkun ttrattata bijoloġikment, iżda jista' jkun siewi li t-test jittenna b'ħama attivat minn sors differenti u/jew il-ħama jkun soġġett għal akklimatazzjoni gradwali.

3. Bil-maqlub, jekk il-kimika għall-ittestjar tkun eliminata bijoloġikament mal-ewwel attentat fit-test ta' simulazzjoni, il-konċentrazzjoni tagħha għandha tiżdied jekk ikun meħtieġ li jkun magħruf jekk il-kimika jkollhiex tkun inibitorja.

4. Wieħed għandu jiftakar meta jipprova jiddetermina l-gradi ta' inibizzjoni li l-massa ta' ħama attivat tista' tinbidel, biex maż-żmien il-mikroorganiżmi jkunu jistgħu jiżviluppaw tolleranza għal kimika inibitorja.

5. Kalkulazzjoni ta' grad ta' inibizzjoni:

Il-perċentwali globali ta' tneħħija ta' R_o, ta' BOD, DOC, COD, eċċ., għall-unitajiet ta' test u kontroll jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

fejn:

I = konċentrazzjoni ta' influwenti ta' BOD, DOC, COD, eċċ, għal reċipjenti ta' ittestjar u kontroll (mg/l)

E = konċentrazzjonijiet ta' effluwenti rispettivi (mg/l).

I u E għandhom ikunu kkoreġuti għal DOC minħabba l-kimika għall-ittestjar fl-unitajiet ta' test; mod ieħor il-kalkulazzjonijiet ta' perċentwali ta' inibizzjoni ma jkunux korretti.

▼**M4**

Il-grad ta' inibizzjoni kkawżat meta jkun hemm il-kimika għall-ittestjar jista' jiġi kkalkulat minn:

$$\% \text{ inibizzjoni} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

fejn:

R_c = perċentwali ta' tneħħija fir-reċipjenti ta' kontroll

R_t = perċentwali ta' tneħħija fir-reċipjenti tal-ittestjar

LETTERATURA:

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness, Bijodegradazzjoni - Test ta' Inibizzjoni ta' Respirazzjoni ta' Ħama Attivat.

(3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Appendiċi 5

Kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma - kimiċi volatili

Kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma

Ftit rapporti jidher li kienu ppubblikati dwar kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux biex jitqiegħdu għal testijiet li jissimulaw trattament ta' ilma mormi (1)(2)(3).

M'hemmx metodu wieħed ta' tixrid tal-kimika għall-ittestjar li huwa applikabbli għas-kimiċi kollha li ma jinħallux. Tnejn mill-erba' tipi ta' metodu deskritti f'ISO 10634 (4) jidhru li huma adatti biex isir attentat għal tixrid ta' kimiċi għal ittestjar ta' simulazzjoni; huma l-użu ta' aġenti emulsjonanti u/jew ta' enerġija ultrasonika. Għandha tkun iffissata l-istabbiltà tul mill-anqas perjodi ta' 24 siegħa tat-tixrid li jirriżulta. Tixridiet stabbilizzati kif jixraq, mqiegħda f'riżerva li titħawwad b'mod kostanti (paragrafu 38), ikunu mbagħad iddożati mat-tank ta' tirwiħ b'mod separat mid-dranaġġ domestiku (jew sintetiku).

Jekk it-tixrid ikun stabbli, stħarreġ kif il-kimika għall-ittestjar tista' tkun iddeterminata fil-forma mxerrda. Aktarx li DOC ma jkunx adatt, għalhekk ikollu jkun stabbilit metodu analitiku speċifiku għall-kimika għall-ittestjar li jkun jista' jiġi applikat għal effluwenti, għal solidi ta' effluwenti u għal ħama attivat. X'jiġri mil-kimika għall-ittestjar fis-simulazzjoni tal-proċess ta' ħama attivat imbagħad ikun iddeterminat f'fażijiet likwidi u solidi. B'hekk ikun stabbilit "bilanċ ta' massa" biex ikun deċiż jekk il-kimika għall-ittestjar kinitx iddegradata bijoloġikament. Iżda dan jindika biss bijodegradazzjoni primarja. Il-wiri ta' bijodegradazzjoni finali għandu jkun attentat bl-applikazzjoni ta' test respirometriku għall-bijodegradabbiltà faċli (il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness (5) C, F jew D) billi jintuża ħama ta' tilqima espost għall-kimika għall-ittestjar fit-test ta' simulazzjoni.

Kimiċi volatili

L-applikazzjoni ta' simulazzjonijiet ta' trattament ta' ilma mormi għal kimiċi volatili hija kemm dibattibbli kif ukoll problematika. Bħal f'kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma, jidher li kienu ftit ħafna r-rapporti li kienu ppubblikati li jiddeskrivu testijiet ta' simulazzjoni bl-użu ta' kimiċi volatili. Ikun adattat tip konvenzjonali ta' apparat li jħallat kollox billi jissiġilla t-tankijiet ta' tirwiħ u sediment, li jkejjel u jikkontrolla l-fluss ta' arja billi jintużaw miters ta' flussi u billi l-gass li joħroġ jgħaddi minn sifuni biex tinġabar materja organika volatili. F'xi każijiet tintuża pompa li toħloq vakwu biex tiġbed il-gass li joħroġ minn sifun "kiesaħ", jew sifun ta' tindif li jkun fih Tenax u ġell tas-silika għal analiżi kromatografika bil-gass. Il-kimika għall-ittestjar li jkun hemm fis-sifun tista' tkun iddeterminata b'mod analitiku.

It-test isir f'żewġ partijiet. L-unitajiet l-ewwel jitħaddmu mingħajr ħama iżda bl-ilma sintetiku mormi flimkien ma' kimika għall-ittestjar li tkun ippumpjata għal ġot-tank ta' tirwiħ. Jinġabru u jkunu analizzati kampjuni ta' influwent, effluwent u gass rilaxxjat għall-kimika għall-ittestjar għal ftit jiem. Mid-dejta miġbura jista' jkun ikkalkulat il-perċentwali (R_{vs}) tal-kimika għall-ittestjar imneżża' mis-sistema.

Mbagħad it-test bijoloġiku normali (bil-ħama) isir f'kondizzjonijiet operazzjonali identiċi għal dawk fl-istudju ta' stripaġġ. Jitkejlu wkoll DOC u COD biex ikun ivverifikat li l-unitajiet ikunu qed jaħdmu b'mod effiċjenti. Kull tant żmien issir analiżi biex tkun iddeterminata l-kimika għall-ittestjar fl-influwent, effluwent u gass li joħroġ fl-ewwel parti tat-test; wara akklimatazzjoni ssir analiżi aktar ta' spiss. Barra dan, mid-dejta fl-istat regolari, jistgħu jkunu kkalkulati l-perċentwali ta' tneħħija tal-kimika għall-ittestjar mill-fażi likwida bil-proċessi kollha (R_T) (fiżiċi u bijoloġiċi), kif ukoll il-proporzjon (R_V) mneżża' mis-sistema.

▼M4

Kalkulazzjoni:

(a) Fit-test mhux bijoloġiku, il-perċentwali (R_{VP}) tal-materjal tat-test imneżża' mis-sistema jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

fejn

R_{VP} = tneħħija ta' kimika għall-ittestjar bil-volatilizzazzjoni (%),

S_{VP} = kimika għall-ittestjar miġbura f'sifun expressa bħala konċentrazzjoni ekwivalenti f'faża likwida (mg/l),

S_{IP} = konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'influwent (mg/l).

(b) Fit-test bijoloġiku, il-perċentwali (R_V) tal-materjal tat-test mneżża' mis-sistema jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

fejn

R_V = tneħħija ta' kimika għall-ittestjar bil-volatilizzazzjoni f'test bijoloġiku (%),

S_V = kimika għall-ittestjar miġbura f'sifun f'test bijoloġiku, espressa bħala konċentrazzjoni ekwivalenti f'influwent likwidu (mg/l),

S_I = konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'influwent (mg/l).

(c) Fit-test bijoloġiku, il-perċentwali (R_T) tal-kimika għall-ittestjar imneħħija bil-proċessi kollha jingħata bi:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

fejn

S_E = konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fl-effluwent (likwidu) (mg/l).

(d) Għalhekk il-perċentwali (R_{BA}) mneħħija b'bijodegradazzjoni flimkien ma' sorbiment jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Għandhom isiru testijiet separati biex ikun iddeterminat iddeterminat jekk il-kimika għall-ittestjar tkunx sorbita; jekk tkun, tista' mbagħad issir korrezzjoni ulterjuri.

(e) Tqabbil bejn il-proporzjon ta' kimika għall-ittestjar imneżża' mis-sistemi tat-test bijoloġiku (R_v) u mhux bijoloġiku (R_{vp}) jindika l-effett globali li trattament bijoloġiku jkun ħalla fuq l-emissjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera.

Eżempju: Benżen

Żmien ta' ritenzjoni ta' ħama = 4 ijiem

Dranaġġ sintetiku; żmien ta' ritenzjoni = 8 sigħat

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Għalhekk,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % u R_{BA} = 85 %.

Ma kienx suppost li l-benżen jiġi sorbit fil-ħama.

LETTERATURA:

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness: Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà 'Faċli'.

▼M4

Appendiċi 6

Effetti taż-żmien ta' ritenzjoni ta' ħama (SRT) fuq it-trattabbiltà ta' kimiċi

DAĦLA

1. Il-metodu deskritt fit-test prinċipali tfassal biex ikun aċċertat jekk ikimiċi ttestjati (is-soltu dawk magħrufin li huma bijodegradabbli b'mod inerenti, iżda mhux malajr) jistgħux ikunu ddegradati bijoloġikament fil-limiti imposti f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi. Ir-riżultati huma espressi skont perċentwali ta' tneħħija u perċentwali ta' bijodegradazzjoni. Il-kondizzjonijiet ta' tħaddim tal-unitajiet ta' ħama attivat u ta' għażla ta' influwent jippermettu x'aktarx varjazzjonijiet wiesgħa f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent. Testijiet isiru f'konċentrazzjoni nominali waħda biss ta' solidi ta' ħama jew f'ħin nominali wieħed ta' retenzjoni ta' ħama (SRT) u reġimi ta' rimi ta' ħama deskritti jistgħu jikkawżaw li l-valur ta' SRT ivarja mhux ħażin matul it-test, kemm minn jum għal ieħor kif ukoll matul jum.

2. F'dan il-varjant (1)(2) l-SRT huwa kkontrollat f'limiti ħafna aktar dojoq matul kull perjodu ta' 24 siegħa (kif sewwasew jiġri fuq l-iskala l-kbira) li jirriżulta f'konċentrazzjoni aktar kostanti fl-effluwenti. Huwa rrakkomandat dranaġġ domestiku minħabba li jagħti perċentwali ta' tneħħija aktar konsistenti u ogħla. L-effetti wkoll ta' għadd ta' valuri ta' SRT ikunu mistħarġa u fi studju aktar dettaljat ikunu jistgħu jiġu ddeterminati l-effetti ta' firxa ta' temperaturi fuq konċentrazzjoni ta' effluwenti.

3. M'hemmx qbil ġenerali s'issa dwar liema mudelli kinetiċi joperaw meta kimiċi jiddegradaw bijoloġikament taħt kondizzjonijiet fi trattament ta' ilma mormi. Ġew magħżula l-mudell Monod tat-tkabbir tal-batterji u l-użu tas-substrat (1)(2) biex jiġu applikati għad-dejta miġbura, għaliex il-metodu kien intenzjonat li jiġi applikat biss għall-kimiċi prodotti f'tunnellati kbar, li jirriżultaw f'konċentraazzjoni ta' dranaġġ ta' iktar minn 1 mg/l. Il-validità tal-mudell simplifikat u l-assunzjonaijiet li saru ġew stabbiliti permezz tal-użu ta' serje ta' ossilati tal-alkoħol li jkollhom gradi varji ta' bijodegradabbilità primarja (2)(3).

Nota. Dan il-metodu ta' varjant isegwi mill-qrib ħafna t-test ta' dan il-metodu C.10-A ta' ttestjar u dawk id-dettalji li huma biss differenti jingħataw hawnhekk aktar 'l isfel.

PRINĊIPJU TAT-TEST

4. Unitajiet ta' borom poruži ta' ħama attivat, mfasslin biex jiffaċilitaw ir-rimi (kważi) kontinwu ta' likwidu mħallat li jippermettu kontroll preċiż ħafna tal-żmien ta' retenzjoni ta' ħama (SRT, jew θ_s), jitħaddmu fil-modalità mhux akkoppjata tul firxa ta' SRTs u, fakultattivament, tul firxa ta' temperaturi. Il-ħin ta' ritenzjoni huwa normalment 2 sa 10 ijiem u t-temperatura bejn 5 u 20 °C. Dranaġġ, preferibbilment domestiku, u soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar jitħalltu b'mod separat mal-unitajiet f'rati li jagħtu ż-żmien meħtieġ ta' retenzjoni ta' dranaġġ (3 sa 6 sigħat) u l-konċentrazzjoni meħtieġa ta' kimika għall-ittestjar fl-influwent. Unitajiet ta' kontroll li ma jirċievi ebda kimika għall-ittestjar jitħaddmu b'mod parallel għal finijiet komparattivi.

5. Tipi oħra ta' apparat jistgħu jintużaw iżda għandha tkun eżerċitata attenzjoni kbira biex ikun żgurat li jintlaħaq kontroll tajjeb ta' SRT. Pereżempju, meta jintużaw impjanti, li jinkorporaw apparat ta' sediment, jista' jkun meħtieġ li jsir tnaqqis għal telf ta' solidi mill-effluwenti tal-impjant. Barra dan, għandhom jittieħdu wkoll prekawzjonijiet speċjali biex ikunu evitati żbalji minħabba varjazzjoni fil-kwantità ta' ħama fl-apparat ta' sediment.

▼M4

6. L-unitajiet jitħaddmu skont is-sett ta' kondizzjonijiet magħżul għal kull waħda minnhom u, wara li jintlaħaq ekwilibriju, il-konċentrazzjonijiet medji ta' stat regolari fl-effluwenti ta' kimika għall-ittestjar u, fakultattivament f'DOC, jinkisbu tul perjodu ta' madwar tliet ġimgħat. Minbarra li jkun ivvalutat il-perċentwali ta' tneħħija ta' kimika għall-ittestjar u, fakultattivament DOC, ir-relazzjoni bejn kondizzjonijiet ta' tħaddim ta' impjant u l-konċentrazzjoni fl-effluwent tkun espressa f'forma grafika. Minn dan ikunu jistgħu jiġu kkalkulati l-kostanti kinetiċi tentattivi u jkunu jistgħu jiġu previsti l-kondizzjonijiet li fihom il-kimika għall-ittestjar tkun tista' tiġi ttrattata.

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR

7. Japplikaw il-paragrafi 12 u 13 tal-Kapitolu C.10 A.

LIVELLI TA' PASS

8. Japplikaw il-paragrafi 14 u 15 tal-Kapitolu C.10 A.

KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR TA' REFERENZA

9. Japplika l-paragrafi 16 tal-Kapitolu C.10 A.

RIŻULTATI RIPRODUĊIBBLI TA' TESTIJIET

10. Japplikaw il-paragrafi 17 u 18 tal-Kapitolu C.10 A.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

11. Unità adatta hija s-sistema modifikata ta' borom poruži (Appendiċi 6.1). Tikkonsisti f'reċipjent intern (jew inforra) magħmula minn polipropilin poruż ta' 3.2 mm ħxuna u pori daqs bejn wieħed u ieħor 90 μm, bil-minċott issaldjat mal-maqbad. (Dan jagħmel unità aktar robusta minn dik deskritta fil-paragrafu 21 ta' dan il-kapitolu, C.10 A). L-inforra titqiegħed f'reċipjent estern tal-polietilen li minnu ma jgħaddix ilma, li jkun magħmul minn żewġ partijiet: bażi tonda li fiha jittaqqbu toqob biex fihom jitpoġġew żewġ linji tal-arja u linja għar-rimi tal-ħama, u ċilindru fin-naħa ta' fuq imwaħħal bil-viti fil-bażi u li jkollu fetħa mqiegħda b'mod li tagħti volum magħruf (3 l) fir-reċipjent tal-borma poruża. Waħda mil-linji tal-arja titwaħħlilha ġebla diffuża u l-oħra tkun miftuħa fit-tarf u mqiegħda f'angolu kwadru mal-ġebla fil-borma. Din is-sistema tipproduċi t-turbulenza meħtieġa biex ikun żgurat li l-kontenut tal-borma jkun tħallat għalkollox, kif ukoll tipprovdi konċentrazzjonijiet ta' ossiġnu maħlul ta' aktar minn 2 mg/l.

12. L-għadd adatt ta' unitajiet jinżamm f'temperaturi kontrollati li jvarjaw minn 5 sa 20 °C (± 1 °C), f'banjijiet bl-ilma fi kmamar b'temperatura kostanti. Ikunu jenħtieġu żewġ pompi biex jiddożaw għal ġor-reċipjenti ta' tirwiħ is-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar u dranaġġ qiegħed fir-rati meħtieġa (0-1.0 ml/min u 0-25 ml/min, rispettivament) u t-tielet pompa biex tneħħi ħama mormi mir-reċipjenti ta' tirwiħ. Ir-rata ta' fluss ta' ħama mormi tintlaħaq billi tintuża pompa ssettjata f'rata ogħla u mħaddma minn ħin għal ieħor bl-użu ta' swiċċ tal-ħin, eż. li jaħdem għal 10 sekondi kull minuta, b'pompa b'rata ta' ħruġ ta' 3 ml/min li tirrendi rata ta' rimi ta' 0,5 ml/min.

Apparat ta' filtrazzjoni jew ċentrifugu

13. Japplika l-paragrafu 23 tal-Kapitolu C.10 A.

Apparat analitiku

14. Japplika l-paragrafu 24 tal-Kapitolu C.10 A.

Ilma

▼M4

15. Japplikaw il-paragrafi 25 u 26 tal-Kapitolu C.10 A.

Midjum organiku

16. Japplika l-paragrafu 27 tal-Kapitolu C.10 A.

Dranaġġ sintetiku

17. Japplika l-paragrafu 28 tal-Kapitolu C.10 A.

Dranaġġ domestiku

18. Japplika l-paragrafu 29 tal-Kapitolu C.10 A.

Ħama attivat

19. Japplika l-paragrafu 30 tal-Kapitolu C.10 A.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar

20. Japplikaw il-paragrafi 31 u 32 tal-Kapitolu C.10 A.

PROĊEDURA

Tħejjija tat-tilqima

21. Japplika biss il-paragrafu 34 tal-Kapitolu C.10 A – uża ħama attivat (dwar 2,5 g/l).

Għadd ta' unitajiet ta' ttestjar

22. Għal test sempliċi, jiġifieri għall-kejl ta' perċentwali ta' tneħħija, ikun jeħtieġ SRT wieħed biss, iżda biex tinkiseb dejta meħtieġa biex jitkejlu kostanti kinetiċi tentattivi jkunu jeħtieġu 4 jew 5 valuri ta' SRT. Is-soltu jintgħażlu valuri bejn 2 u 10 ijiem. Prattikament, ikun konvenjenti li jsir test f'4 jew 5 SRTs fl-istess waqt f'temperatura waħda; fi studji estiżi jintużaw l-istess valuri ta' SRT, jew forsi firxa differenti ta' valuri, f'temperaturi oħra li jvarjaw minn 5 sa 20 °C. Għal bijodegradazzjoni primarja (l-użu ewlieni), normalment tkun meħtieġa unità waħda għal kull sett ta' kondizzjonijiet. Iżda għal bijodegradabbiltà finali tkun meħtieġa unità ta' kontroll, għal kull sett ta' kondizzjonijiet, li tirċievi dranaġġ iżda mhux kimika għall-ittestjar. Jekk il-kimika għall-ittestjar titqies li tkun fid-dranaġġ użat, ikun meħtieġ li jintużaw unitajiet ta' kontroll meta tkun qed tiġi vvalutata bijodegradazzjoni primarja, u li ssir il-korrezzjoni meħtieġa fil-kalkulazzjonijiet.

Dożaġġ ta' midjum organiku u kimika għall-ittestjar

23. Japplikaw il-paragrafi 36 sa 39 tal-Kapitolu C.10 A, iżda nnota li s-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar tkun iddożata separatament u li jintużaw diversi rati ta' rimi ta' ħama. Immonitorja u aġġusta wkoll sikwit, jekk ikun meħtieġ, sa ± 10 %, ir-rata ta' fluss ta' influwenti, effluwenti u rimi ta' ħama, eż. darbtejn kuljum. Jekk jinqalgħu diffikultajiet fil-metodi analitiċi meta jintuża dranaġġ domestiku, agħmel it-test bi dranaġġ sintetiku, iżda għandu jkun żgurat li midja differenti jagħtu dejta kinetika komparabbli.

Maniġġar ta' unitajiet ta' ħama attivat

24. Japplikaw il-paragrafi 40 sa 43 tal-Kapitolu C.10 A, iżda kkontrolla l-SRT permezz tal-ħela "kostanti" tal-ħama biss.

Teħid ta' kampjuni u analiżi

25. Japplikaw il-paragrafi 44 sa 50 tal-Kapitolu C.10 A, ħlief li l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun iddeterminata u DOC ikun iddeterminat fakultattivament; m'għandux jintuża COD.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

26. Japplikaw il-paragrafi 52 sa 54 tal-Kapitolu C.10 A.

Espressjoni ta' riżultati tat-testijiet

27. Japplikaw il-paragrafi 56 sa 62 tal-Kapitolu C.10 A.

Kalkolu ta' kostanti kinetiċi

28. Huwa aktar realistiku li tkun ikkwotata l-konċentrazzjoni medja tal-istat regolari tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent u li jkun deskritt kif dan ivarja ma' kondizzjonijiet ta' tħaddim ta' impjant milli li jkun ikkwotat il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni primarja. Dan jista' jsir billi titqies l-ekwazzjoni (6) fl-Appendiċi 6.2, li tista' tirrendi valuri għal K_S, μ_m u θ_{SC}iż-żmien kritiku ta' retenzjoni ta' ħama.

(Alternattivament, valuri approssimattivi ta' K_S u μm jistgħu jinksibu permezz ta' programm sempliċi tal-kompjuter mfassal għall-kurva teoretika kkalkulata mill-ekwazzjoni 2 (Appendiċi 6.2) għall-valuri esperimentali miksuba. Għalkemm kwalunkwe soluzzjoni mogħtija mhux se tkun unika, tista' tinkiseb appromissazzjoni raġonevoli ta' K_S u μ_m.)

Varjabbiltà ta' riżultati

29. Hija esperjenza komuni li jinkisbu valuri varjabbli ta' parametri kinetiċi għal kimiċi individwali. Huwa maħsub li l-kondizzjonijiet li fihom il-ħama jkun tkabbar, kif ukoll il-kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test użat (bħal fil-paragrafu 5 u f'testijiet oħra), għandhom effett kbir fuq il-valuri li jirriżultaw. Aspett wieħed ta' din il-varjabbiltà kien diskuss minn Grady *et al* (4), li ssuġġerew li t-termini "eżistenti" u "intrinsiku" għandhom ikunu applikati għal żewġ kondizzjonijiet estremi li jirrappreżentaw il-limiti ta' stat li kultura tista' tilħaq matul esperiment kinetiku. Jekk l-istat ma jitħalliex jinbidel matul it-test, il-valuri tal-parametru kinetiku jirriflettu l-kondizzjonijiet fl-ambjent li minnu l-mikroorganiżmi jkunu ttieħdu; dawn il-valuri jissejħu "eżistenti" jew eżistenti bħalissa. Fl-estrem l-ieħor, jekk kondizzjonijiet fit-test ikunu tali li jippermettu l-iżvilupp sħiħ tas-sistema li tissintetizza l-proteina billi tippermetti rata ta' tkabbir kemm jista' jkun massima, il-parametri kinetiċi miksubin jingħad li jkunu "intrinsiċi", u jkunu dipendenti biss minn natura tas-substrat u mit-tipi ta' batterja fil-kultura. Bħala gwida, valuri eżistenti jinkisbu billi l-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' substrat għal mikroorganiżmi kompetenti (S_o/X_o) jinżamm baxx, eż. 0.025, u jkun hemm valuri intrinsiċi meta l-proporzjon ikun għoli eż. mill-anqas 20. Fiż-żewġ każijiet, S_o għandu jkun ugwali għal jew jaqbeż il-valur rilevanti ta' Ks, il-kostant ta' nofs saturazzjoni.

30. Il-varjabbiltà u aspetti oħra ta' bijodegradazzjoni kinetika kienu diskussi f'workshop riċenti ta' SETAC (5). Minn studji bħal dawn, rapportati u proġettati, għandha toħroġ ma ddumx stampa aktar ċara ta' kinetika li topera f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi biex tgħin ikun hemm interpretazzjoni aħjar ta' dejta eżistenti, kif ukoll biex tissuġġerixxi disinji aktar rilevanti għal Metodi ta' Ttestjar fil-ġejjieni.

LETTERATURA:

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

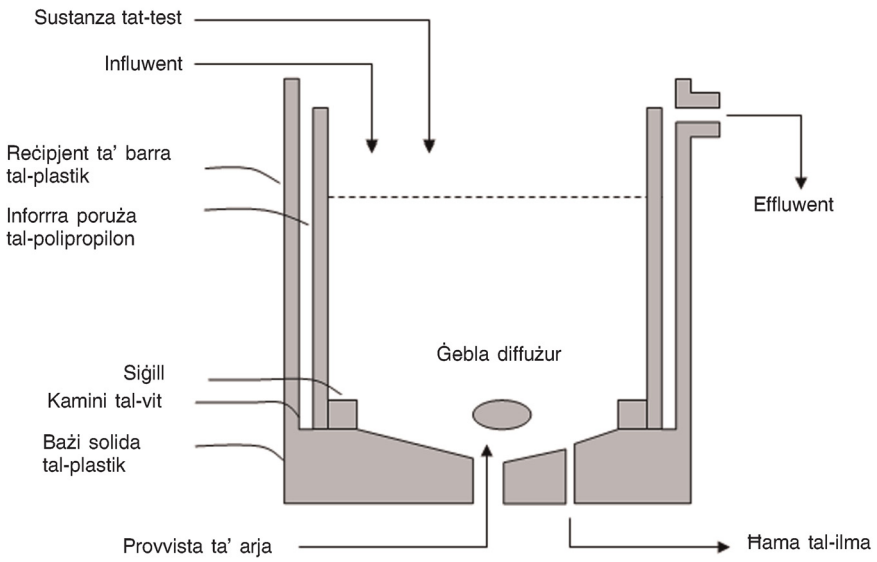
(4) Grady CPL, Smets BF u Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Ewropa, Brussell.

▼**M4**

Appendiċi 6.1

Borma Poruża b'Kontroll SRT



▼M4

Appendiċi 6.2

Kalkolu ta' Kostanti kinetiċi

1. Jekk wieħed jassumi li l-kinetika Monod tapplika u meta jitqies bilanċ ta' massa ta' solidi u substrat attivi fis-sistema kollha ta' ħama attivat (1), jistgħu jinkisbu dawn l-espressjonijiet ta' stat regolari li ġejjin:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

jew

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

Fejn:

S_1 = konċentrazzjoni ta' substrat fl-effluwent, (mg/l)

K_S = kostant ta' nofs saturazzjoni, il-konċentrazzjoni li fiha $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = rata speċifika ta' tkabbir (d^{-1})

μ_m = valur massimu ta' μ_m (d^{-1})

K_d = rata speċifika ta' diżintegrazzjoni ta' solidi attivi (d^{-1})

θ_S = żmien medju ta' retenzjoni ta' ħama, SRT (d)

Eżami ta' din l-ekwazzjoni jwassal għall-konklużjonijiet li ġejjin:

(i) Il-konċentrazzjoni tal-effluwenti hija indipendenti minn dik fl-influwent (S_0); għalhekk, il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni tvarja mal-konċentrazzjoni tal-influwenti, S_0.

(ii) L-uniku parametru ta' kontroll ta' impjanti li jaffettwa S_1 huwa ż-żmien ta' retenzjoni ta' ħama, θ_S.

(iii) Għal konċentrazzjoni partikolari fl-influwent, S_0, ikun hemm żmien kritiku ta' retenzjoni ta' ħama, b'mod li:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

Fejn:

θ_{SC} = żmien kritiku ta' retenzjoni ta' ħama, li taħtu l-mikroorganiżmi kompetenti jintefgħu 'l barra mal-ħasil tal-impjant.

(iv) Minħabba li l-parametri l-oħra fl-ekwazzjoni (2) huma assoċjati ma' kinetika ta' tkabbir, it-temperatura aktarx taffettwa l-livell tas-substrat tal-effluwent u ż-żmien kritiku li jkollu l-ħama, jiġifieri ż-żmien ta' ritenzjoni ta' ħama meħtieġ biex jinkiseb ċertu grad ta' trattament jiżdied mat-tnaqqis fit-temperatura.

2. Minn bilanċ ta' massa ta' solidi fis-sistema ta' borma poruża, u jekk wieħed jassumi li l-konċentrazzjoni ta' solidi fl-effluwent tal-impjant, X_2, tkun baxxa mqabbla ma' dik fir-reċipjent ta' tirwiħ, X_1, il-żmien ta' ritenzjoni ta' ħama

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

▼**M4**

u

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

fejn

V = volum tar-reċipjent ta' tirwiħ (l)

X_1 = konċentrazzjoni ta' solidi fir-reċipjent ta' tirwiħ (mg/l)

X_2 = konċentrazzjoni ta' solidi fl-effluwent (mg/l)

Q_0 = rata ta' fluss tal-influwent (l/d)

Q_1 = rata ta' fluss ta' ħama mormi (l/d)

Għalhekk ikun possibbli li jkun ikkontrollat iż-żmien ta' ritenzjoni ta' ħama f'kull valur magħżul minn qabel bil-kontroll tar-rata ta' fluss ta' ħama mormi, Q_1.

Konklużjonijiet:

3. L-għan ewlieni tat-test huwa, għalhekk, li jħalli jkun hemm il-konċentrazzjoni tal-effluwenti, u b'hekk ikunu previsti l-livelli ta' kimika għall-ittestjar fl-ilmijiet li jirċevuhom.

4. Bl-immarkar ta' S_1, vs. θ_S, il-ħin kritiku ta' retenzjoni ta' ħama, θ_{SC}, jista' minn xi daqqiet ikun evalwat malajr, eż. il-kurva 3 fil-Figura 1. Meta dan mhux possibbli, θ_{SC} jista' jiġi kkalkulat, flimkien ma' valuri approssimattivi μ_m u K_S, bl-immarkar ta' S_1, vs. $S_1 \bullet \theta_S$.

Arranġament mill-ġdid tal-ekwazzjoni (1) jagħti

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Jekk K_d jkun żgħir, allura $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ u [5] isir:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Għalhekk, il-grafika għandha tkun linja dritta (ara l-Figura 2) tal-anglu $1/\mu_m$ u l-interċezzjoni K_S/μ_m; ukoll $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figura 1

Tliet temperaturi; ħames SRTs

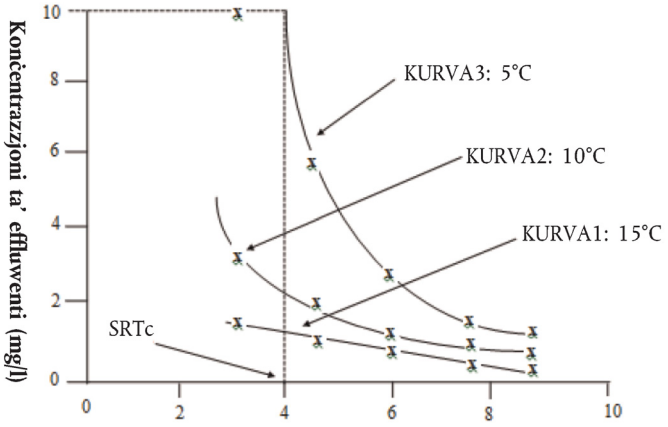
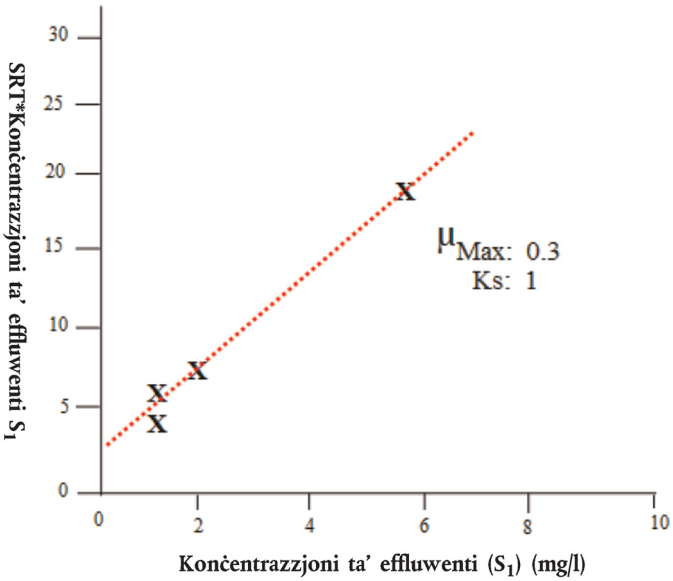


Figura 2

Linja ta' Rigressjoni SRT S_1 vs S_1 fuq T = 5 °C



Glossarju:

Konċentrazzjoni ta' effluwenti:

Kurva:

▼M4

Appendiċi 7

TEST F'FIRXA TA' (µg/l) KONĊENTRAZZJONI BAXXA

1. Ħafna kimiċi normalment ikunu jinsabu fl-ambjent akwatiku, f'ilmijiet mormija wkoll, f'konċentrazzjonijiet baxxi ħafna (µg/l). F'konċentrazzjonijiet bħal dawn probabbli li dawn ma jservux bħala substrati primarji li jirriżultaw fi tkabbir, iżda x'aktarx li jiddegradaw f'substrati sekondarji, mingħajr tkabbir, fl-istess żmien ma' varjetà ta' kimiċi tal-karbonju li jseħħu b'mod naturali. Għaldaqstant id-degradazzjonijiet ta' kimiċi bħal dawn ma jkunux jaqblu mal-mudell deskritt fl-Appendiċi 6. Hemm ħafna mudelli li jistgħu jkunu applikati u, skont il-kondizzjonijiet li jkun hemm f'sistemi ta' trattament ta' ilma mormi, aktar minn wieħed jista' jkun simultanjament operattiv. Tkun meħtieġa ħafna aktar riċerka biex titfa' dawl fuq din il-problema.

2. Sadattant tista' tkun segwita l-proċedura mogħtija fit-test prinċipali (il-Kapitolu C.10 A), iżda għall-bijodegradabbiltà primarja biss, billi jintużaw konċentrazzjonijiet baxxi adatti (< 100 µg/l) u proċedura analitika vvalidata. Il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni jista' jkun ikkalkulat (ara para. 54 tal-Metodu ta' Ttestjar) iżda għandhom jitqiesu proċessi abijotiċi (sorbiment, volatilità, eċċ.). Eżempju huwa l-istudju ta' Nyholm u sħabu (1)(2) li użaw ċiklu ta' 4 sigħat f'sistema ta' kuntatt. Irrapportaw kostanti psewdo tal-ewwel ordni għal 5 kimiċi miżjuda f'dranaġġ sintetiku f'5 sa 100µg/l. (Għall-aħħar bijodegredabbiltà l-kimiċi għall-ittestajr bit-tikketta ^{14}C jistgħu jintużaw. Deskrizzjoni ta' dan tmur lil hinn mill-kamp ta' applikazzjoni ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar minħabba li s'issa għad m'hemmx proċeduri maqbula, għalkemm metodu propost għal ISO 14592 (3) għandu gwida dwar l-użu ta' kimiċi bit-tikketta ^{14}C

Test SCAS

3. Wara kien propost test aktar sempliċi f'żewġ stadji (4)(5)(6); il-metodu ta' ħama attivat nofsu kontinwu (SCAS) ikun segwit minn testijiet kinetiċi għal żmien qasir fuq kampjuni meħudin minn unitajiet ta' SCAS. Is-sistema SCAS titħaddem b'rati ta' rimi ta' ħama magħrufin (mhux bħal metodu oriġinali tat-test C.12) u jiddaħħlilha dranaġġ sintetiku tal-OECD modifikat jew dranaġġ domestiku. Id-dranaġġ sintetiku kien immodifikat (minħabba bdil fil-valur tal-pH u ħama bi ftit sedimentazzjoni) biż-żieda ta' fosfat bħala lqugħ, estratt ta' ħmira, klorur tal-ħadid (III) u traċċa ta' element ta' melħ u COD tiegħu miżjud għal madwar 750 mg/l billi żdiedet il-konċentrazzjoni ta' peptun u estratt tal-laħam. L-unitajiet tħaddmu f'ċiklu ta' 24 siegħa: tirwiħ għal 23 siegħa, rimi ta' ħama, sedimentazzjoni, rtirar ta' supernatant (effluwent) u kien segwit b'żieda ta' dranaġġ sintetiku flimkien ma' kimika għall-ittestjar, sa 100 µg/l, (jiġifieri f'madwar l-istess konċentrazzjoni użata fit-test għal żmien qasir). Darba fil-ġimgħa 10 % tat-total ta' ħama nbidel b'ħama frisk biex tinżamm massa mikrobika bilanċjata.

4. Il-konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar jitkejlu fil-bidu u fi tmiem tirwiħ u t-test jitkompla sakemm tinkiseb tneħħija kostanti ta' kimika għall-ittestjar; dan jieħu minn ġimgħa sa diversi xhur.

Test għal żmien qasir

5. Ikun applikat test qasir (eż. 8 sigħat) biex ikun iddeterminat il-kostant ta' rata kinetika tal-ewwel grad (psewdo) għad-diżintegrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'ħama attivat ta' oriġinijiet u stejjer magħrufin iżda differenti. B'mod partikolari, jittieħdu kampjuni ta' ħama mir-reatturi ta' SCAS fit-tmiem ta' perjodu ta' tirwiħ meta l-konċentrazzjoni ta' substrat organiku tkun baxxa - matul il-perkors ta' esperiment ta' akklimatazzjoni (paragrafi 3, 4). Ħama jista' jittieħed ukoll minn unità parallela ta' SCAS li

▼M4

ma tkunx esposta għall-kimika għall-ittestjar, biex jitqabbel. Taħlitiet ta' ħama u l-kimika għall-ittestjar miżjuda f'żewġ konċentrazzjonijiet jew aktar fil-firxa 1-50 μg/l jitrewħu, mingħajr ma jiżdied dranaġġ sintetiku jew substrat organiku ieħor. il-kimika għall-ittestjar li tifdal f'soluzzjoni tkun iddeterminata f'intervalli regolari, eż. kull siegħa skont kemm tkun degradabbli l-kimika, għal perjodu mhux itwal minn 24 siegħa. Kampjuni jkunu ssoġġettati għal azzjoni ċentrifuga qabel analiżi xierqa.

Kalkulazzjonijiet

6. Dejta mill-unitajiet ta' SCAS tintuża biex ikun ikkalkulat il-perċentwali ta' tneħħija ta' kimika għall-ittestjar (paragrafu 54). Kostant ta' rata medja, K_1, (innormalizzat għal konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi) jista' wkoll ikun ikkalkulat minn:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

fejn:

t = ħin ta' tirwiħ (23h)

C_e = konċentrazzjoni fi tmiem ta' perjodu ta' tirwiħ (μg/l)

C_i = konċentrazzjoni fil-bidu ta' tirwiħ (μg/l)

SS = konċentrazzjoni ta' solidi ta' ħama attivat (g/l)

7. Fit-test għal żmien qasir il-konċentrazzjoni log % li jifdal tkun immarkata skont il-ħin, u l-anglu tal-parti tal-bidu (10-50 % degradazzjoni) tal-grafika jkun ekwivalenti għal K_1, il-kostant tal-ewwel grad (psewdo). Il-kostant ikun innormalizzat fir-rigward tal-konċentrazzjoni ta' solidi ta' ħama billi l-anglu jkun diviż bil-konċentrazzjoni ta' solidi ta' ħama. Ir-riżultat irrapportat għandu jinkludi wkoll dettalji ta' konċentrazzjonijiet tal-bidu tal-kimika għall-ittestjar u solidi sospiżi, żmien ta' ritenzjoni ta' ħama, tagħbija u sors ta' ħama, u dettalji ta' espożizzjoni minn qabel (jekk ikun hemm) għall-kimika għall-ittestjar.

Varjabbiltà ta' riżultati

8. Il-varjabbiltà u aspetti oħra ta' bijodegradazzjoni kinetika kienu diskussi f'workshop riċenti ta' SETAC (7). Minn studji bħal dawn, rapportati u proġettati, għandha toħroġ ma ddumx stampa aktar ċara ta' kinetika li topera f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi biex tgħin ikun hemm interpretazzjoni aħjar ta' dejta eżistenti, kif ukoll biex tissuġġerixxi disinji aktar rilevanti għal Metodi ta' Ttestjar fil-ġejjieni.

LETTERATURA:

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT u Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Bijoriti

DAĦLA

1. Testijiet ta' simulazzjoni normalment ikunu applikati għal kimiċi li ma jkunux għaddew minn test ta' tgħarbil għal bijodegradabbiltà faċli (il-Kapitolu C.4 A sa F ta' dan l-Anness (9)), iżda li jkunu għaddew minn test għal bijodegradabbiltà inerenti. B'mod eċċezzjonali t-testijiet ta' simulazzjoni jiġu applikati wkoll għal kwalunkwe kimika li dwarha tkun meħtieġa iktar informazzjoni, speċjalment kimiċi ta' ħafna tunnellati, u normalment jiġi applikat it-test tal-ħama attivat (C.10 A). F'xi ċirkostanzi, madankollu, tkun meħtieġa informazzjoni speċifika marbuta mal-aġir ta' kimika mal-metodi tat-trattament tal-ilma mormi inkluż bijoriti, l-katar filtri li jnixxu jew li jqattru, kontatturi bijoloġiċi li jduru, sodod fluwidizzati. Biex din il-ħtieġa tintlaqa' kienu żviluppati diversi apparati.

2. Gerike *et al*. (1) użaw filtri li jqattru kbar fuq skala pilota li ġew utitlizzati fil-mudell akkoppjat. Dawn il-filtri ħadu ħafna spazju u kienu jeħtieġu volumi relattivament kbar ta' dranaġġ jew dranaġġ sintetiku. Truesdale *et al*. (2) iddeskrivew filtri iżgħar (6 piedi x 6 pulzieri dijametru) li għaddewlhom dranaġġ naturali mingħajr tensjoattivi iżda li x'aktarx kienu għadhom jeħtieġu volumi kbar. Kienu meħtieġa mhux anqas minn 14-il ġimgħa biex kienet żviluppata bijorita "matura" u kienu jeħtieġu minn 4 sa 8 ġimgħat oħra wara li ddaħħal għall-ewwel darba t-tensjoattiv tat-test qabel ma saret akklimatazzjoni.

3. Baumann *et al.* (3) żviluppaw filtru ħafna aktar iżgħar li uża "suf verġni" tal-poliester li qabel kien mgħaddas f'ħama attivat bħala l-midjum inerti li kien iżomm il-bijorita. il-kimika għall-ittestjar intużat bħala l-uniku sors ta' karbonju, u l-bijodegradabbiltà kienet ivvalutata minn kejlijiet ta' karbonju organiku maħlul (DOC) fl-influwent u fl-effluwent, u mill-ammont ta' CO_2 fil-gass li joħroġ.

4. Approċċ pjuttost differenti ittieħed minn Gloyna *et al.* (4) li vvintaw ir-reattur tubulari li jdur. Fuq il-wiċċ ta' ġewwa tat-tubu li jdur kienet tkabbret bijorita fuq l-erja magħrufa tal-wiċċ bil-passaġġ ta' influwent imdaħħal fit-tarf ta' fuq tat-tubu, inklinat f'angolu żgħir lejn l-orizzontali. Ir-reattur intuża biex tkun studjata l-bijodegradabbiltà ta' tensjoattivi (5), kif ukoll biex tkun mistħarrġa l-aħjar ħxuna ta' bijorita u tixrid mir-rita (6). Dawn l-awturi tal-aħħar żviluppaw ulterjorment ir-reattur, inkluż li mmoddifikawh biex ikun jista' jiddetermina CO_2 fil-gass li joħroġ.

5. Ir-reattur tubulari li jdur kien adottat mill-Kumitat Permanenti ta' Analisti (UK) bħala metodu standard għall-valutazzjoni kemm tal-bijodegradabbiltà ta' kimiċi (7) kif ukoll tat-trattabbiltà u tat-tossiċità ta' ilmijiet mormija (8). Il-metodu deskritt hawnhekk għandu l-vantaġġi tas-sempliċità, il-kumpattezza, ir-riproduċibbiltà u l-ħtieġa għal volumi relattivament żgħar ta' midjum organiku.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Dranaġġ sintetiku jew domestiku, u l-kimika għall-ittestjar, f'taħlita jew waħedhom, ikunu applikati fuq il-wiċċ ta' ġewwa ta' tubu inklinat li jdur bil-mod. Saff ta' mikroorganiżmi, jixbhu lil dawk li jkun hemm fuq midja ta' bijofiltri, jinbena fuq il-wiċċ ta' ġewwa. Il-kondizzjonijiet ta' tħaddim tar-reattur jintgħażlu biex jeliminaw b'mod adegwata materja organika u, jekk ikun meħtieġ, ossidazzjoni tal-ammonju.

▼M4

7. Effluwent mit-tubu jingabar u jew joqgħod u/jew jiġi ffiltrat qabel analiżi għal karbonju organiku maħlul (DOC) u/jew għall-kimika għall-ittestjar b'metodu speċifiku. Unitajiet ta' kontroll li ma jirċievu ebda kimika għall-ittestjar jitħaddmu b'mod parallel bl-istess kondizzjonijiet għal għanijiet komparattivi. Id-differenza bejn il-konċentrazzjonijiet ta' DOC fl-effluwent u l-unitajiet ta' test u kontroll hija preżunta li tkun dovuta minħabba l-kimika għall-ittestjar u l-metaboliti organiċi tagħha. Din id-differenza titqabbel mal-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar miżjuda (bħala DOC) biex tkun ikkalkulata l-eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

8. Il-bijodegradazzjoni tista' normalment tingħaraf minn bijosorbiment b'eżami sewwa tal-kurva ta' eliminazzjoni-żmien/ħin. Konferma s-soltu tkun tista' tinkiseb billi jkun applikat test għal bijodegradazzjoni faċli (konsum ta' ossiġnu jew produzzjoni ta' diossidu tal-karbonju) billi tintuża tilqima akklimatizzata meħuda fit-tmiem tat-test mir-reatturi li jirċievu l-kimika għall-ittestjar.

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR

9. Il-purezza, is-solubilità fl-ilma, u l-karatteristiċi volatili u ta' sorbiment tal-kimika għall-ittestjar għandhom ikunu magħrufa biex jista' jkun hemm interpretazzjoni korretta tar-riżultati li jkollhom isiru.

10. Normalment, kimiċi volatili u li ftit jinħallu ma jistgħux ikunu t-testjati sakemm ma jitteħdux prekawzjonijiet speċjali (ara l-Appendiċi 5 tal-Kapitolu C.10 A). L-istruttura kimika, jew għall-anqas il-formula empirika, għandhom wkoll ikunu magħrufa biex ikunu kkalkulati valuri teoretiċi u/jew biex ikunu vverifikati valuri mkejla ta' parametri, eż. domanda teoretika ta' ossiġnu (ThOD), DOC.

11. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganiżmi (ara l-Appendiċi 4 tal-kapitolu C.10 A) jistgħu jkunu utli biex jintgħażlu konċentrazzjonijiet xierqa ta' testijiet u jistgħu jkunu essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri baxxi ta' bijodegradazzjoni.

LIVELLI TA' PASS

12. Oriġinarjament, il-bijodegradazzjoni primarja ta' aġenti tensjoattivi kien jeħtiġilha tilħaq 80 % jew aktar qabel ma l-kimika setgħet titqiegħed fis-suq. Jekk il-valur ta' 80 % ma jintlaħaqx, jista' jkun applikat dan it-test ta' simulazzjoni (konfermatorju) u t-tensjoattiv ikun jista' jitqiegħed fis-suq biss jekk titneħħa aktar minn 90 % tal-kimika speċifika. Għal kimiċi inġenerali mhix kwistjoni ta' livell ta' jekk ikunx hemm pass/falliment u l-valur ta' perċentwali ta' tneħħija jista' jintuża f'kalkulazzjonijiet prossimi tal-konċentrazzjoni ambjentali probabbli biex jintuża fi stimi tal-perikli li jġibu kimiċi. F'għadd ta' studji ta' kimiċi puri l-perċentwali ta' tneħħija ta' DOC instab li kien > 90 % f'aktar minn tliet kwarti, u > 80 % f'aktar minn 90 %, ta' kimiċi li wrew xi grad sinifikanti ta' bijodegradabbiltà.

KIMIĊI TA' REFERENZA

13. Biex ikun żgurat li l-proċedura sperimentali tkun qed titwettaq b'mod korrett, ikun utli kull tant żmien li jkunu ttestjati kimiċi ta' referenza li mġibthom tkun magħrufa. Kimiċi bħal dawn jinkludu aċidu adipiku, 2-fenil fenol, 1-naftol, aċidu 'difeniku' u aċidu 1-naftoiku.

RIŻULTATI RIPRODUĊIBBLI TAT-TESTIJIET

14. Id-devjazzjoni standard relattiva f'testijiet instabet mil-laboratorju fir-Renju Unit li kienet ta' 3,5 % u li bejn testijiet kienet ta' 5 % (7).

▼M4

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

Reatturi tubi li jduru

15. L-apparat (ara l-figuri 1 u 2 fl-Appendiċi 8) jikkonsisti minn sodda ta' tubi tal-akrilik kull wieħed 30,5 cm twil u 5 cm dijametru intern, appoġġat fuq roti tal-lasktu li jkunu ġo qafas ta appoġġ tal-metall. Kull tubu għandu xoffa, madwar 0,5 cm fonda, biex iżżommu fuq ir-roti, il-wiċċ intern huwa magħmul aħrax bil-wire wool raff, u hemm xoffa interna fond 0,5 cm fit-tarf ta' fuq (għalf) biex iżżomm il-likwidu. It-tubi huma inklinati f'angolu ta' madwar grad wieħed lejn l-orrizont biex jiksbu l-ħin tal-kuntatt meħtieġ meta il-midjum tat-test jiġi applikat għal tubu nadif. Ir-roti bil-lakstu jiddawru b'mutur ta' veloċità varjabbli, bil-mod. It-temperatura tat-tubi tiġi kkontrollata b'installazzjoni f'kamra li għandha temperatura kostanti.

16. Billi kull reattur tubu jingħalaq ġewwa tubu ftit akbar, bil-għatu u jkun żgurat li ma jkunx jista' joħroġ gass mill-konnessjonijiet, gass CO_2 li joħroġ ikun jista' jinġabar f'soluzzjoni ta' alkalina għal kejl sussegwenti (6).

17. Provvista ta' 24 siegħa, għal kull tubu, ta' midjum organiku b'kimika għall-ittestjar miżjuda jekk applikabbli, titqiegħed f'reċipjent ta' ħżin (A) ta' 20 l (A) (ara l-Figura 2). Jekk ikun meħtieġ, is-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar tista' tiġi ddożata separatament. Qrib il-qiegħ ta' kull reċipjent ta' ħżin ikun hemm fetħa li tkun ikkunnettjata b'sistema adatta ta' tubi, eż. lastku tas-silikon, permezz ta' pompa peristaltika (B), ma' tubu ta' ħruġ magħmul mill-ħġieġ jew silikon li jidħol minn 2 sa 4 cm fit-tarf ta' fuq (għalf) tat-tubu inklinat (C). L-effluwent jitħalla jqattar mit-tarf ta' isfel tat-tubu inklinat biex jinġabar f'reċipjent ieħor ta' ħżin (D). L-effluwent għandu joqgħod jew ikun iffiltrat qabel analiżi.

Apparat ċentrifugu ta' filtrazzjoni

18. Ikun hemm apparat għal filtrazzjoni ta' kampjuni b'filtru ta' membrani ta' porożità adatta (dijametru ta' apertura nominali ta' 0,45 μm) li jassorbi kimiċi organiċi jew li jerħi karbonju organiku għal grad minimu. Jekk jintużaw filtri li jerħu karbonju organiku, aħsilhom sewwa b'ilma sħun biex tneħħi karbonju organiku li jlissi. Alternattivament jista' jintuża ċentrifugu li jkun kapaċi jagħmel 40 000 m/sec^2.

19. Tagħmir analitiku biex ikun iddeterminat:

— DOC/karbonju organiku totali (TOC) jew domanda kimika ta' ossiġnu (COD);

— kimika speċifika (HPLC, GC, eċċ.) jekk tkun meħtieġa;

— pH, temperatura, aċidità, alkalinità;

— ammonju, nitrit, nitrat, jekk it-testijiet isiru f'kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni.

Ilma

20. Ilma tal-vit, li jkun fih anqas minn 3 mg/l DOC.

21. Ilma distillat jew dejonizzat, li jkun fih anqas minn 2 mg/l DOC.

▼M4

Midjum organiku

22. Jista' jintuża dranaġġ sintetiku, dranaġġ domestiku jew taħlita tat-tnejn bħala l-midjum organiku. Intwera li l-użu ta' dranaġġ domestiku waħdu sikwit jagħti perċentwali ogħla ta' tneħħija ta' DOC (f'unitajiet ta' ħama attivat) u jħalli wkoll li jkun hemm bijodegradazzjoni ta' xi kimiċi, li ma jiġux iddegradati bijoloġikament meta jintuża dranaġġ sintetiku tal-OECD. Għalhekk huwa rrakkomandat l-użu ta' dranaġġ domestiku. Kejjel il-konċentrazzjoni ta' DOC (jew COD) f'kull lott ġdid ta' midjum organiku. L-aċidità jew l-alkalinità tal-midjum organiku għandha tkun magħrufa. Il-midjum jista' jeħtieġ li jiżdiedlu lqugħ xieraq (idroġenu karbonat tas-sodju jew fosfat tal-idroġenu tal-potassju), jekk ikun ta' aċidità jew alkalinità baxxi, biex jinżamm pH ta' dwar 7,5 + 0,5 fir-reattur matul it-test. L-ammont ta' lqugħ, u meta għandu jiżdied, għandhom ikunu deċiżi każ każ.

Dranaġġ sintetiku

23. Ħoll f'kull litru ilma tal-vit: peptun, 160 mg; estratt tal-laħam, 110 mg; urea, 30 mg; fosfat anidru tal-idroġenu tad-dipotassju (K_2HPO_4), 28 mg; klorur tas-sodju, (NaCl), 7 mg; klorur tal-kalċju diidrat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; sulfat tal-maġniżju eptaidrat ((Mg_4SO_2.7H20), 2 mg. Dan id-dranaġġ sintetiku tal-OECD huwa eżempju u jagħti konċentrazzjoni medja tad-DOC fl-influwent ta' madwar 100 mg/l. Alternattivament, uża kompożizzjonijiet oħrajn, b'madwar l-istess konċentrazzjoni tad-DOC, li huma eqreb għad-dranaġġ reali. Dan id-dranaġġ sintetiku jista' jsir f'ilma ddistillat f'forma kkonċentrata u jinħażen f'madwar 1 °C sa mhux aktar minn ġimgħa. Meta jkun hemm bżonnu, raqqu bl-ilma tal-vit. (Dan il-midjum mhux sodisfaċenti, eż. il-konċentrazzjoni ta' nitroġenu hija għolja ħafna, relattivament b'kontenut ta' karbonju baxx, iżda ma kien issuġġerit xejn aħjar, ħlief li jiżdied aktar fosfat bħala lqugħ u peptun żejjed).

Dranaġġ domestiku

24. Uża dranaġġ qiegħed frisk miġbur kuljum minn xogħlijiet ta' trattament li jirċievu b'mod predominanti dranaġġ domestiku. Dan għandu jinġabar mill-kanal tat-tifwir tat-tank ta' sedimentazzjoni primarja, jew mill-għalf għall-impjant tal-ħama attivat, u jkun kważi kollu ħieles minn partiċelli raffi. Id-dranaġġ ikun jista' jintuża wara l-ħżin għal diversi jiem f'madwar 4 °C, jekk ikun ippruvat li DOC (jew COD) ma jkunux naqsu b'mod sinifikanti (jiġifieri b'anqas minn 20 %) matul ħżin. Biex ikun illimitat taqlib fis-sistema, DOC (jew COD) ta' kull lott ġdid għandhom ikunu aġġustati qabel ma jintużaw għal valur kostanti xieraq, eż. b'dilwizzjoni bl-ilma tal-vit.

Lubrikant

25. Jistgħu jintużaw gliċerol jew żejt taż-żebbuġa għal-lubrikazzjoni tar-rombli tal-pompa peristaltika: it-tnejn huma tajbin biex jintużaw fuq tubi tal-lastku tas-silikon.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' kimika għall-ittestjar

26. Għal kimiċi li jinħallu b'mod adegwat ħejji soluzzjonijiet ta' stokkijiet f'konċentrazzjonijiet xierqa (eż. 1 sa 5 g/l) f'ilma dejonizzat jew fil-porzjon minerali tad-dranaġġ sintetiku. Għall-kimiċi li ma jinħallux, ara l-Appendiċi 5 fil-kapitolu C.10-A. Dan il-metodu mhux tajjeb għal kimiċi volatili mingħajr modifiki għar-reatturi tubu (paragrafu 16). Iddetermina DOC u TOC tas-soluzzjoni ta' stokkijiet u tenni l-kejlijiet għal kull lott ġdid. Jekk id-differenza bejn DOC u TOC tkun aktar minn 20 %, ivverifika jekk il-kimika għall-ittestjar tinħallx fl-ilma. Qabbel DOC jew il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar imkejla b'analiżi speċifika

▼M4

tas-soluzzjoni ta' stokkijiet mal-valur nominali biex taċċerta jekk l-irkupru jkunx tajjeb biżżejjed (normalment jista' jkun mistenni > 90 %). Aċċerta, l-aktar għal tixrid, jekk jistax jintuża DOC jew le bħala parametru analitiku jew jekk tistax tintuża biss teknika analitika b'mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar. Ċentrifugazzjoni tal-kampjuni tkun meħtieġa għal tixrid. Għal kull lott ġdid, kejjel DOC, COD jew il-kimika għall-ittestjar ma' analiżi speċifika.

27. Iddetermina pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Valuri estremi jindikaw li ż-żieda tal-kimika jista' jkollha influwenza fuq pH tal-ħama attivat fis-sistema ta' ttestjar. F'dan il-każ innewtralizza s-soluzzjoni ta' stokkijiet biex tikseb pH ta' 7 ± 0,5 b'ammonti żgħar ta' aċidu jew bażi inorganiċi, iżda evita l-preċipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

PROĊEDURA

Tħejjija ta' midjum organiku għal dożar

28. Żgura li kontenituri ta' influwenti u effluwenti u tubi minn reċipjenti ta' influwenti u għal reċipjenti ta' effluwenti jitnaddfu sewwa biex tneħħi tkabbir mikrobiku, fil-bidu u matul it-test kollu.

29. Ħejji d-dranaġġ sintetiku (paragrafu 23) frisk kuljum mis-solidi jew mis-soluzzjoni konċentrata ta' stokkijiet b'dilwizzjoni adatta b'ilma tal-vit. Kejjel l-ammont meħtieġ f'ċilindru u żid f'reċipjent nadif ta' influenti. Jekk ikun meħtieġ, żid ukoll l-ammont meħtieġ tas-soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar jew tal-kimika ta' referenza mad-dranaġġ sintetiku qabel id-dilwizzjoni. Jekk ikun aktar konvenjenti jew ta' ħtieġa biex ikun evitat telf tal-kimika għall-ittestjar, ħejji soluzzjoni separata dilwita tal-kimika għall-ittestjar f'riżerva separata u għaddi din fit-tubi inklinati permezz ta' pompa differenti tad-dożaġġ.

30. Alternattivament (u preferibbilment), uża dranaġġ qiegħed domestiku (paragrafu 24) miġbur frisk kuljum jekk ikun possibbli.

Tħaddim ta' reatturi tubi li jduru

31. Ikunu meħtieġa żewġ reatturi tubi identiċi għall-valutazzjoni ta' kimika waħda ta' ttestjar, u jitgħaqqdu f'kamra b'temperatura kostanti normalment ta' 22 ± 2 °C.

32. Aġġusta l-pompi peristaltiċi biex iwasslu 250 ± 25 ml/h tal-midjum organiku (mingħajr kimika għall-ittestjar) fit-tubi inklinati, li jiddawru bi 18 ± 2 rpm. Applika l-lubrikant (paragrafu 25) lit-tubi tal-pompa fil-bidu u perjodikament permezz tat-test biex tiżgura funzjonament sewwa u biex ittawwal il-ħajja tas-sistema tat-tubi.

33. Aġġusta l-angolu tax-xaqliba tat-tubi mal-orizzontali biex tipproduċi żmien ta' residenza ta' 125 ± 12,5 kull sekonda għall-għalf f'tubu nadif. Agħmel stima taż-żmien ta' ritenzjoni billi żżid marka mhux bijoloġika (eż. NaCl, kulurant inerti) lill-għalf: iż-żmien li l-konċentrazzjoni tieħu biex tilħaq l-aqwa tagħha fl-effluwent jitqies li jkun il-żmien medju ta' retenzjoni (meta jkun hemm rita massima, iż-żmien ta' ritenzjoni jista' jiżdied sa madwar 30 minuta).

34. Dawn ir-rati, veloċitajiet u ħinijiet instabu li jneħħu b'mod adegwat (> 80 %) ta' DOC (jew ta' COD) u li jipproduċu effluwenti nitrifikati. Ir-rata ta' fluss għandha tinbidel jekk tneħħija ma tkunx suffiċjenti jew jekk il-prestazzjoni ta' impjant partikolari ta' trattament ikollha tkun issimulata. F'dan il-każ tal-aħħar, aġġusta r-rata ta' dożar tal-midjum organiku sakemm il-prestazzjoni tar-reattur tkun taqbel ma' dik tal-impjant ta' trattament.

▼M4

Tilqim

35. Tilqim li jinġarr mal-arja jista' jkun suffiċjenti biex jinbeda t-tkabbir ta' mikroorganiżmi meta jintuża dranaġġ sintetiku, iżda minbarra dak żid 1 ml/l ta' dranaġġ qiegħed mal-għalf għal 3 ijiem.

Kejl

36. F'intervalli regolari ara li r-rati ta' doża u l-voloċitajiet ta' tidwir ikunu fil-limiti meħtieġa. Kejjel ukoll il-pH tal-effluwent, l-aktar jekk tkun mistennija nitrifikazzjoni.

Teħid ta' kampjuni u analiżi

37. Il-metodu, xejra u frekwenza ta' teħid ta' kampjuni jintgħażlu biex ikunu adatti għall-fini tat-test. Pereżempju, ħu kampjuni każwali (jew f'daqqa) kampjuni ta' influwent u effluwent, jew iġbor kampjuni tul perjodu itwal, eż. 3-6 sigħat. Fl-ewwel perjodu, mingħajr kimika għall-ittestjar, ħu kampjuni darbtejn fil-ġimgħa. Iffiltra l-kampjuni minn membrani jew ċentrifugu f'madwar 40 000 m/sec^2 għal madwar 15-il minuta (paragrafu 18). Jista' jkun ħemm il-ħtieġa li l-kampjuni joqogħdu u/jew li jkunu ffiltrati b'mod raff qabel il-filtrazzjoni b'membrani. Iddetermina DOC (jew COD) mill-anqas b'mod duplikat u, jekk ikun meħtieġ, BOD, ammonju u nitrit/nitrat.

38. Kull analiżi għandha ssir malajr kemm jista' jkun wara l-ġbir u t-tħejjija tal-kampjuni. Jekk analiżi jkollha tiġi posposta, aħżen il-kampjuni f'madwar 4 °C fid-dlam fi fliexken mimlijin u magħluqin issikkati. Jekk kampjuni jkollhom jinħażnu għal aktar minn 48 siegħa, ippreservahom fil-friża, b'aċidifikazzjoni jew biż-żieda ta' kimika tossika adatta (eż. 20 ml/l ta' soluzzjoni ta' 10 g/l ta' klorur tal-merkurju (II)). Żgura li t-teknika ta' preservazzjoni ma tinfluwenzax ir-riżultati ta' analiżi.

Perjodu tal-bidu (running-in)

39. F'dan il-perjodu, il-bijorita tal-wiċċ tikber biex tilħaq l-aħjar ħxuna, li s-soltu tieħu madwar ġimagħtejn u m'għandhiex tieħu aktar minn 6 ġimgħat. It-tneħħija (paragrafu 44) ta' DOC (jew ta' COD) tiżdied u tilħaq valur ta' livell kostanti. Meta l-fażi ta' livell kostanti tintlaħaq f'valur simili fiż-żewġ tubi, jintgħażel wieħed biex ikun ta' kontroll fil-bqija tat-test, li matulu l-prestazzjoni tagħhom għandha tibqa' konsistenti.

Dħul ta' kimika għall-ittestjar

40. F'dan l-istadju żied il-kimika għall-ittestjar mar-reattur l-ieħor fil-konċentrazzjoni meħtieġa, normalment 10-20 mg C/l. Il-kontroll ikompli jirċievi l-midjum organiku waħdu.

Perjodu ta' akklimatazzjoni

41. Kompli bl-analiżi darbtejn fil-ġimgħa għal DOC (jew COD) u, jekk ikollha tkun ivvalutata l-bijodegradabbiltà primarja, kejjel ukoll il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar b'analiżi speċifika. Ħalli minn ġimgħa sa sitt ġimgħat (jew aktar f'kondizzjonijiet speċjali) wara li l-kimika għall-ittestjar tkun iddaħħlet għall-ewwel darba biex isseħħ akklimatazzjoni. Meta l-perċentwali ta' tneħħija (paragrafi 43-45) jilħaq valur massimu, ikseb valuri validi minn 12-15 fil-fażi ta' livell kostanti tul madwar 3 ġimgħat għal evalwazzjoni tal-perċentwali medja ta' tneħħija. It-test jitqies lest jekk jintlaħaq grad għoli biżżejjed ta' eliminazzjoni. Normalment, taqbiżx żmien ta' 12-il ġimgħa ta' kemm idum test wara l-ewwel żieda tal-kimika għall-ittestjar.

▼M4

Ħrif tar-rita

42. It-tneħħija f'daqqa ta' kwantitajiet kbar ta' rita żejda mit-tubi, jew ħrif, isseħħ relattivament f'intervalli regolari. Biex tiżgura li ma tkunx affettwata l-komparabbiltà ta' riżultati, ħalli t-testijiet ikopru mill-anqas żewġ ċikli kbar ta' tkabbir u ħrif.

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

43. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC (jew ta' COD) tal-kimika għall-ittestjar għal kull valutazzjoni li jkun itteħdilha l-ħin billi tuża l-ekwazzjoni:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

fejn

D_t = perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC (jew ta' COD) f'ħin t;

Cs = konċentrazzjoni ta' DOC (jew ta' COD) fl-influwent minħabba l-kimika għall-ittestjar, preferibbilment stmata mill-konċentrazzjoni fi, u mill-volum miżjud, tas-soluzzjoni ta' stokkijiet (mg/l);

E = DOC (jew COD) mkejla fl-effluwent tat-test f'ħin t (mg/l);

Eo = DOC (jew COD) mkejla fl-effluwent tal-kontroll f'ħin t (mg/l).

Tenni l-kalkulazzjoni għall-kimika ta' referenza, jekk ittestjata.

Prestazzjoni tar-reattur ta' kontroll

44. Il-grad ta' eliminazzjoni (D_B) ta' DOC (jew ta' COD) tal-midjum organiku fir-reattur ta' kontrolli huwa informazzjoni utli biex tkun ivvalutata l-attività bijodegradattiva tal-bijorita matul it-test. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni bl-ekwazzjoni:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

fejn

Cm = DOC (jew COD) tal-midjum organiku fl-influwent tal-kontroll (mg/l).

45. Ikkalkula t-tneħħija (D_{ST}) tal-kimika għall-ittestjar, jekk titkejjel, b'metodu analitiku speċifiku f'valutazzjoni ta' kull darba bl-ekwazzjoni:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

fejn

Si = konċentrazzjoni mkejla jew, preferibbilment, stmata ta' kimika għall-ittestjar fl-influwent tat-test (mg/l)

Se = konċentrazzjoni mkejla tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent tat-test f'ħin t (mg/l)

▼M4

Jekk il-metodu analitiku jagħti valur pożittiv f'ekwivalenti ta' dranaġġ mhux mibdul għal S_c mg/l, ikkalkula l-perċentwali ta' tneħħija (D_{SC}) minn:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Espressjoni ta' riżultati tat-testijiet

46. Immarka l-perċentwali ta' eliminazzjoni D_t u D_{ST} (jew D_{SC}), jekk ikunu disponibbli, kontra l-ħin (ara l-Appendiċi 2 fil-Kapitolu C.10- A). Ħu l-medja (espressa sal-eqreb numru sħiħ) u l-istandard ta' devvjazzjoni tal-valuri 12-15 għal D_T (u għal D_{ST}, jekk ikunu disponibbli) miksubin fil-fażi ta' livell kostanti bħala l-perċentwali ta' tneħħija tal-kimika għall-ittestjar. Mill-forma tal-kurva ta' eliminazzjoni, jistgħu jinstiltu xi konklużjonijiet dwar il-proċessi ta' tneħħija.

Sorbiment

47. Jekk tkun osservata eliminazzjoni għolja ta' DOC tal-kimika għall-ittestjar fil-bidu tat-test, il-kimika għall-ittestjar aktarx tkun eliminata b'sorbiment għal fuq il-bijorita. Jista' jkun possibbli li dan jiġi ppruvat permezz ta' diterminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar assorbita fuq solidi ħrif mir-riti. Mhux normali għall-eliminazzjoni tad-DOC ta' kimiċi assorbiti li jibqgħu għoljin matul it-test kollu; normalment, ikun hemm fil-bidu grad għoli ta' tneħħija li bil-mod il-mod jinżel għal valur ta' ekwilibriju. Iżda jekk il-kimika għall-ittestjar assorbita setgħet ikkawżat akklimatazzjoni tal-massa mikrobika, l-eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar DOC susseg-wentement għandha tiżdied u tilħaq livell kostanti għoli.

Fażi ta' intervalli

48. Bħal f'dawk statiċi, f'testijiet ta' tgħarbil ħafna kimiċi għall-ittestjar jeħtieġu fażi ta' intervalli qabel ma sseħħ bijodegradazzjoni sħiħa. Fil-fażi ta' inter-valli, akklimatazzjoni (jew adattament) tal-batterja kompetenti sseħħ mingħajr ma kważi titneħħa l-kimika għall-ittestjar; mbagħad iseħħ it-tkabbir tal-bidu ta' dawn il-batterji. Din il-fażi tintemm u l-fażi ta' degra-dazzjoni titqies arbitrarjament li tkun bdiet meta jitneħħa madwar 10 % tal-ammont tal-bidu ta' kimika għall-ittestjar (wara li jkun tqies is-sorbiment, jekk iseħħ). Il-fażi ta' intervalli sikwit tkun varjabbli ħafna u bilkemm riproduċibbli.

Fażi ta' livell kostanti

49. Il-fażi ta' livell kostanti ta' kurva ta' eliminazzjoni f'test kontinwu hija ddefinita bħala dik il-fażi li fiha sseħħ id-degradazzjoni massima. Din il-fażi għandha ddum mill-anqas 3 ġimgħat u jkollha madwar 12-15-il valur validu mkejjel.

Grad medju ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar

50. Ikkalkula l-valur medju mill-valuri ta' eliminazzjoni D_t (u D_s, jekk ikunu disponibbli) tal-kimika għall-ittestjar fil-fażi ta' livell kostanti. Miġjub għad-dritt sal-eqreb numru sħiħ (1 %), dan ikun il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Huwa wkoll irrakkomandat li jkun ikkalkulat l-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-valur medju. B'mod simili kkalkula l-grad medju (D_B) ta' eliminazzjoni tal-midjum organiku fir-reċipjent ta' kontroll.

▼M4

Indikazzjoni ta' bijodegradazzjoni

51. Jekk il-kimika għall-ittestjar ma tassorbix b'mod sinifikanti mill-bijorita u l-kurva ta' eliminazzjoni jkollha forma tipika ta' kurva ta' bijodegradazzjoni b'intervall, ta' fażijiet ta' degradazzjoni u ta' livell kostanti (paragrafi 48, 49), l-eliminazzjoni mkejla tista' kważi fiċ-ċert tkun attribwita lill-bijodegradazzjoni. Jekk tkun seħħet tneħħija inizjali għolja, it-test ta' simulazzjoni ma jkunx jista' jiddivrenzja bejn proċessi ta' eliminazzjoni bijoloġiċi u abijotiċi. F'każijiet bħal dawn, u f'każijiet oħra fejn ikun hemm xi dubju dwar il-bijodegradazzjoni (eż. jekk isir stripaġġ), analizza kimika għall-ittestjar assorbita fuq kampjuni tar-rita jew agħmel testijiet statiċi addizzjonali (tgħarbil) għall-bijodegradabbiltà ibbażati fuq parametri li jindikaw b'mod ċar proċessi bijoloġiċi. Testijiet bħal dawn huma l-metodi ta' konsum ta' ossiġnu (Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness D, E u F) (9) jew test li jkejjel il-produzzjoni ta' CO_2 (Kapitolu C.4-C ta' dan l-Anness) jew il-metodu Spazju Fuq) (10); uża bħala tilqima esposta minn qabel bijorita mir-reattur adatt.

52. Jekk kemm it-tneħħija ta' DOC, kif ukoll it-tneħħija ta' kimika speċifika jkunu tkejlu, differenzi sinifikanti (tal-ewwel ikunu anqas minn tal-aħħar) bejn il-perċentwali mneħħija jindikaw li kien hemm fl-effluwenti prodotti organiċi intermedji, li jistgħu jkunu aktar diffiċli li jiddegradaw; dawn għandhom ikun mistħarġa.

Validità ta' riżultati tat-testijiet

53. Qis it-test bħala validu jekk il-grad ta' eliminazzjoni (DB) ta' DOC (jew ta' COD) fl-unitajiet ta' kontroll ikun > 80 % wara ġimagħtejn ta' tħaddim u ma tkun saret ebda osservazzjoni mhux tas-soltu.

54. Jekk kimika (ta' referenza) bijodegradabbli faċilment tkun ġiet ittestjata, il-grad ta' bijodegradazzjoni għandu jkun > 90 % u d-differenza bejn valuri duplikati m'għandhiex tkun akbar minn 5 %. Jekk dawn iż-żewġ kriterji ma jitħarsux, eżamina mill-ġdid il-proċeduri sperimentali u/jew ikseb dranaġġ domestiku minn sors ieħor.

55. Bl-istess mod, differenzi bejn valuri ta' degradazzjoni minn unitajiet duplikati (jekk jintużaw) li jittrattaw kimika għall-ittestjar m'għandhomx ikunu differenti b'aktar minn 5 %. Jekk dan il-kriterju ma jitħarisx iżda t-tneħħija tkun għolja, kompli bl-analiżi għal tliet ġimgħat oħra. Jekk it-tneħħija tkun baxxa, stħarreġ l-effetti inibitorji tal-kimika għall-ittestjar jekk ma jkunux magħrufin u tenni t-test f'konċentrazzjoni aktar baxxa ta' kimika għall-ittestjar, jekk dak ikun fattibbli.

Rapport tat-test

56. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Kimika għall-ittestjar:

— dejta ta' identifikazzjoni;

— natura fiżika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi.

Kondizzjonijiet tat-test:

— kull modifika għas-sistema ta' ttestjar, l-aktar jekk ikunu ttestjati kimiċi li ma jinħallux jew ikunu volatili;

— tip ta' midjum organiku;

— proporzjon u natura ta' skart industrijali fid-dranaġġ, jekk jintużaw u jekk ikunu magħrufa;

— metodu ta' tilqim;

▼M4

— soluzzjoni ta' stokkijiet ta' kimiċi għall-ittestjar – kontenut ta' DOC (karbonju organiku maħlul) u TOC (karbonju organiku totali); kif titħejja, jekk ta' sospensjoni; konċentrazzjoni(jiet) użata/i tat-test, raġunijiet jekk ikunu 'l barra mill-firxa 10-20 mg/l DOC; metodu ta' żieda; data tal-ewwel żieda; kull bidla fil-konċentrazzjoni;

— ħin medju ta' retenzjoni idrawlika (b'ebda tkabbir); veloċità ta' rotazzjoni tat-tubu; angolu approssimattiv tax-xaqliba, jekk ikun possibbli;

— dettalji ta' ħrif; ħin u intensità;

— temperatura tat-test u firxa;

— tekniċi analitiċi użati.

Riżultati tat-testijiet:

— dejta mkejla kollha ta' DOC, COD, analiżi speċifika, pH, temperatura, kimiċi N, jekk rilevanti;

— id-dejta kollha kkalkolata ta' D_t (jew D_{tc}), D_B, D_{St} miksuba f'forma tabulari u l-kurvi ta' eliminazzjoni;

— informazzjoni dwar fażijiet ta' intervalli u ta' livelli kostanti, durata ta' testijiet, il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, tal-kimika ta' referenza (jekk ittestjata) u tal-midjum organiku (fl-unità ta' kontroll), flimkien ma' dejta ta' statistika u dikjarazzjonijiet dwar il-bijodegradabbiltà u l-validità tat-test;

— diskussjoni dwar ir-riżultati.

LETTERATURA:

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G u Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà 'Faċli' A-F.

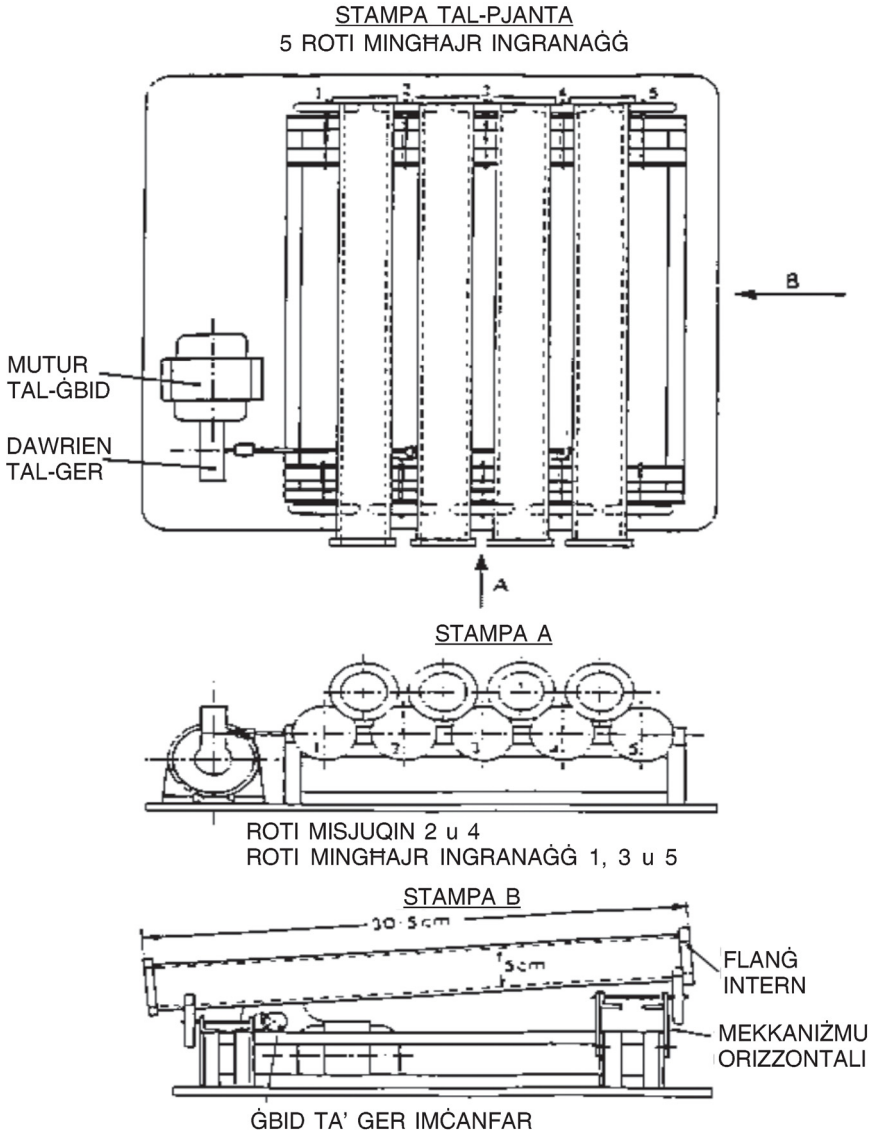
(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Appendiċi 8

Figura 1

Tubi li jduru



Glossarju:

Stampa tal-pjanta:

Stampa A/B:

Roti misjuqin:

Roti mingħajr ingranaġġ:

Mutur tal-ġbid:

Dawrien tal-ger:

Flanġ intern:

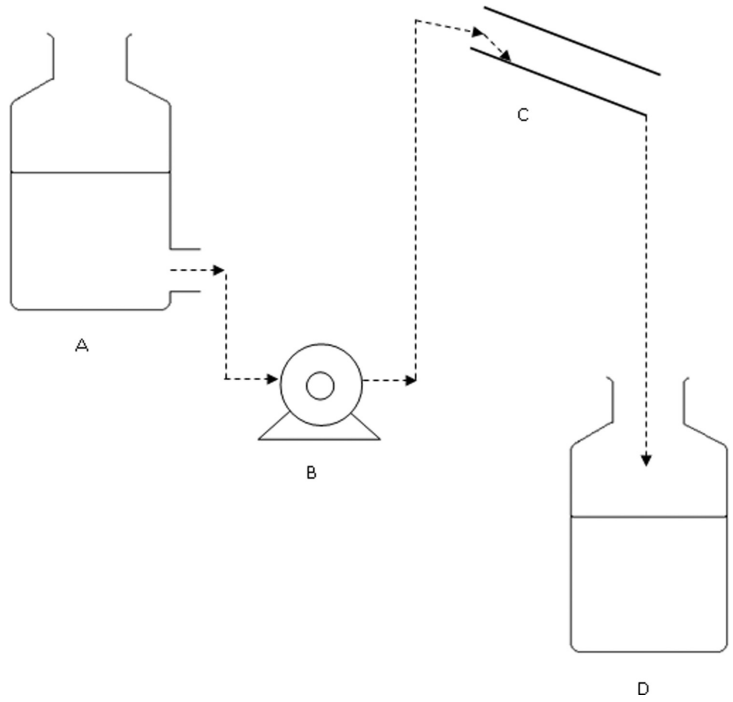
Mekkaniżmu orizzontali:

Ġbid ta' ger imċanfar:

▼**M4**

Figura 2

Dijagramma ta' fluss



A: Tank tal-Għalf

B: Pompa Peristaltika

C: Tubu li Jdur

D: Reċipjent għal Ġbir ta' Effluwenti

DEFINIZZJONIJIET:

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Kimiċi: "Għandu jkun innotat li l-fraži "kimika" tintuża ġeneralment fil-ftehimiet tal-UNCED u f'dokumenti li ġew wara biex tinkludi sustanza, prodotti, taħlitiet, tħejjijiet, jew kull fraži oħra li tista' tintuża f'sistemi eżistenti biex jindikaw "kopertura"."

▼B

C.11. **BIJODEGRADAZZJONI**

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-bijodegrabilità.

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 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 mg O_2 ta' tajn għal kull siegħa.

▼B

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:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \% \text{ perċentwalita'inibizzjoni}$$

Fejn:

R_s = rata ta' konsum ta' ossiġinu f'konċentrazzjoni ttestjata ta' sostanza tat-test,

R_{c1} = 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-sensittività 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 tliet siegħat) ta' 3,5-diklorofenol huwa fl-ambitu aċċettat ta' 5 sa 30 mg/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.

▼B

1.6.1.2. Taħlita tas-sostanza ta' kontroll

Taħlita ta' 5,5-diklorofenol tista', per eżempju, tkun ippreparata billi jinħallu 0,5 g 3,5-dikolorofenol f'10 ml ta' 1M NaOH, maħlula f'madwar 30 ml ta' ilma distillat, biż-żieda ta' 0,5 M H_2SO_4 sal-punt ta' preċipitazzjoni inċipjenti – madwar 8ml ta' 0,5 M 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 jitħalltu flimkien l-ammonti ta' sostanzi li ġejjin f'litru ilma:

— 16 g Pepton

— 11 g Estratti mil-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-bijodegrabilità 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 0º sa 4º C, għal mhux aktar minn ġimgħa, f'kondizzjonijiet li ma jikkawżaw l-ebda biddla fil-kompożizzjoni 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, eż. 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.

▼B

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 ± 2º C. Dan jinżamm aerjat għall-użu matul il-jum. Qabel ma jintuża, il-pH għandu jitkejjel 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)
Arloġġ ta' l-ossiġinu	Nadifa, mingħajr żejt. Fluss ta' arja ta' 0,5 sa 1 litru/minuta
Fornitura ta' l-arja:	Flixkun bil-qiegħ ċatt, bħall-flixkun tat-tip BOD
Apparat li jkejjel:	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	eż. 3,5-diklorofenol (ta' l-anqas tlett konċentrazzjonijiet)
Kontrolli:	Kampjun inokulat mingħajr s-sostanza tat-test
Temperatura:	20 ± 2º 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).

▼B

Il-konteniturі tat-test għandhom jiġu aerjati kontinwament sabiex jassiguraw li l-O_2maħlul fl-ilma ma jaqgħax taħt 2,3 mg/litru u li, immeddjatament qabel ma tiġI mkejla 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, bleċċezzjoni 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' konteniturі li fihom konċentrazzjonijiet differenti tas-sostanza tat-test. Fl-aħħar, għandi jiġi ppreparat t-tieni kontroll (C_2).

Wara tlett siegħat il-pH huwa mkejjel, u kampjun imħallat sew talkontenuti ta' l-ewwel ħames konteniturі huwa mferra' fl-apparat li jkejjel u r-rata ta' respirazzjoni hija mkejla 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 siegħat.

Is-sostanza ta' referenza huwa ttestjat f'kull kampjun ta' incolumu mikrobiku bl-istess mod.

Reġim differenti (eż. 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, konteniturі oħrajn huma ppreparati li fihom s-sostanza tat-test, drenaġġ sintetiku u ilma, imma mingħajr tajn attivat. Il-konsum ta' l-ossiġinu jitkejjel u rrekordjat wara perjodu ta' aerjazzjoni ta' 30 minuta u/jew tlett siegħat (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 mkejla 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 siegħat) 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 malkonċentrazzjoni 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.

▼B

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 mkejla 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 mkejla

  — 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_{80}

  — 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.

▼B

C.12. **BIJODEGRADAZZJONI**

TEST SCAS MODIFIKAT

1. **METODU**

1.1. INTRODUZZJONI

L-għan tal-metodu huwa l-valutazzjoni tal-bijodegrabilità 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' 4º 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-faża 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 akkliatizzati għall-użu tagħhom f'testijiet oħrajn.)

F'dan il-metodu, l-kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbon organiku maħlul huwa użat sabiex jistima l-bijodegrabilità aħħarija tas-sostanzi tat-test. Huwa preferibbli li jiġi ddeterminat id-DOC wara l-aċidifikazzjoni u l-tindif milli bħala d-differenza Ctotali – Cinorganika

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 għal 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.

▼B

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:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

fejn

D_{da} = degradazzjoni/żieda ta' kuljum.

2. Il-perċentwali tat-tneħħija D_{ssd} ta' l-ammont tas-sostanza fil-bidu ta' kull jum:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

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.

▼B

1.3. SOSTANZI TA' REFERENZA

Fċerti każijiet, meta xi sostanza ġdida tkun qed tiġi investigata, s-sostanzi ta' referenza jistgħu jkunu ta' benefiċċju, però, 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 semikontinwu (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-bijodegradazzjoni 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 mkejla (bijodegrabilità 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-bijodegradazzjoni 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 presaturati 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.

▼B

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 bijodegradazzjoni.

Konċentrazzjonijiet ogħla huma permessi jekk it-tossiċità tal-mikroganiżmi tippermettiha.

Il-kontenut tal-karbon organiku tat-taħlita ta' l-istokk hija mkejla.

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.

▼B

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 jixorbux 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, eċċ..,

— raġunijiet xjentifiċi għall-xi tibdil fil-proċedura tat-test,

— firma u data.

▼B

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 fiżikokemikali 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 sseħħx l-akklimatizazzjoni.

Jekk għandha ssir distinzjoni bejn il-biodegradazzjoni (jew bijodegradazzjoni 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 respiromatiku).

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 jinstab mill-materja tat-test blank.

4. **REFERENZI**

(1) OECD, Pariġi, 1981, Linji Gwida għat-Testijet, 302 A, Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali.

▼B

Appendiċi 1

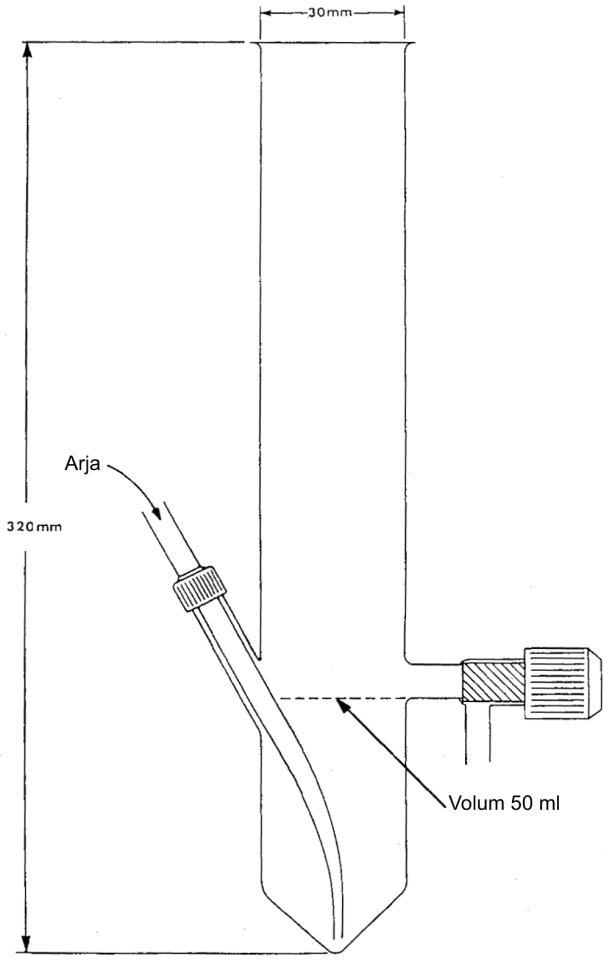
Test SCAS: eżempju tar-riżultati

Sostanza	C_T (mg/1)	$C_t - C_c$ (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

▼B

Appendiċi 2

Eżempju ta' l-apparatus tat-test



▼B

C.13. **BIJOKONĊENTRAZZJONI: *FLOW-THROUGH FISH TEST***

1. **METODU**

Dan il-metodu ta' bijokonċentrazzjoni hu repetizzjoni ta' l-OECD TG 305 (1996).

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-metodu jiddiskrivi proċedura sabiex jiġi karatterizzat il-potenzal tal-bijokonċentrazzjoni ta' sustanzi fil-ħut taħt kondizzjonijiet li jgħaddi minnhom. Għalkemm ittestjar tar-reġimi li jgħaddi minnu għandhom bil-wisq jiġu preferuti, reġimi semistatiċi huma permessi, ladarba l-kriterja tal-validità huma sodisfatti.

Il-metodu jagħti dettalji suffiċjenti sabiex l-ittestjar jiġi maħdum filwaqt li jippermetti libertà adegwata sabiex jiġi xieraq id-disinn sperimentali għall-kondizzjonijiet f'laboratorji partikolari u sabiex jiġu varjati l-karatteristiċi tat-test tas-sustanzi. Huwa aktar validament applikat għall-kimiċi organiċi stabbli b'valuri log tal-P_{ow} bejn il-1,5 u s-6,0 (1), iżda għadu jista' jiġi applikat għall-sustanzi superlipholic (li jkollhom il-log tal-P_{ow} baxx > 6,0). L-istima li saret qabel tal-fattur tal-biokonċentrazzjoni (BCF), xi kultant tiddenota bħala K_B, ladarba t-tali sustanzi superlipophilic għandhom ikunu presumibbilment ogħla mill-fattur tal-stat stabbli (BCF_{SS}) il-valur mistenni li jiġi miksub mill-esperimenti tal-laboratorju. Stimi li saru qabel tal-fattur tal-biokonċentrazzjoni għall-kimiċi organiċi b'valuri log tal-P_{ow} sa bejn wieħed u ieħor 9,0 jistgħu jiġu miksuba billi tkun użata l-ekwazzjoni tal-Bintein et al (2). Il-parametri li jikkaratterizzaw il-potenzal tal-biokonċentrazzjoni jinkludu r-rata kostanti tad-dħul (k_1), it-tisfija tar-rata kostanti (k_2) u l-BCF_{SS}.

Sustanzi ta' l-ittestjar ittikettati tar-radjazzjoni jistgħu jiffaċilitaw l-analiżi ta' l-ilma u tal-kampjuni tal-ħut u jistgħu jintużaw sabiex jiġi ddeterminat/sabiex jiddetermina jekk l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni degradanti għandhomx jiġu magħmula jew le. Jekk residwi totali radjuattivi jkunu mkejla (per eżempju permezz ta' kombustjoni jew tessut solubbli), il-BCF huwa bbażat fuq kompost tal-ġenitur, kull metabolite miżmuma u wkoll karbonju assimilat. Il-BCFs bbażati fuq residwi totali radjuattivi ma jistgħux, għalhekk, jkunu direttament imqabbla ma' BCF derivati minn analiżi kimika speċifika tal-kompost tal-ġenitur biss.

Proċeduri ta' tindifa sewwa jistgħu jiġu mpjegati fl-istudji ttikettati tar-radjazzjoni sabiex jiġi determinat il-BCF ibbażat fuq il-kompost tal-ġenitur, u l-metabolite maġġuri tistà tiġi karatterizzata jekk ikun maħsub li jkun neċessarju. Huwa wkoll possibbli li tgħaqqad l-istudju tal-metaboliżmu tal-ħut ma' l-istudju tal-biokonċentrazzjoni bl'analiżi u l-identifikazzjoni tar-residwi fit-tessuti.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Biokonċentrazzjoni/bioakkumulazzjoni hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar ġo jew fuq organiżmu (tessuti speċifiċi tiegħu) relattiv mal-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar fil-mezz li jiċċirkundah.

Il-fattur tal-bijokonċentrazzjoni (BCF jew K_B) f'kull ħin matul il-faži tad-dħul ta' dan l-ittestjar ta' l-akkumulazzjoni hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar ġo/fuq il-ħut jew it-tessuti speċifiċi tagħha (C_f bħala µg/g (ppm)) diviżi mill-konċentrazzjoni tal-kimika fil-mezz li jdawru(Cw bħala µg/ml (ppm)).

▼B

Il-fattur ta' l-istat stabbli tal-bijokonċentrazzjoni (BCF_{SS} jew K_B) ma jinbidilx b'mod sinifikattiv fuq perjodu mġedded ta' żmien, il-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar tal-mezz li jdawru matul dan il-perjodu ta' ħin.

Kondizzjoni jew stat stabbli hija milħuqa fl-għemil tas-sustanza ta' l-ittestjar bil-ħut (C_f) kontra l-ħin meta l-kurva ssir parallela ma' l-assi tal-ħin u tlett analiżi taċ-C_f magħmula fuq kampjuni meħuda waqt l-intervalli ta' mill-inqas jumejn huma ma' l-± 20 % ta' xulxin, u ma hemmx differenzi sinifikattivi bejn it-tliet perjodi tat-teħid tal-kampjuni. Meta l-kampjuni miġbura flimkien ikunu analizzati huma meħtieġ mill-inqas erba' analiżi suċċessivi. Għas-sustanzi ta' l-ittestjar li huma meħuda bil-mod jkun aktar xieraq li l-intervalli jkunu ta' sebat ijiem.

Fatturi tal-bijokonċentrazzjoni kalkulati direttament mir-rata kostanti kinetika (k_1/k_2) huma msejħa fattur tal-konċentrazzjoni kinetika, il-BCF_K.

Il-qsim tal-koeffiċjent ta' l-octanol-water (P_{ow}) huwa l-proporzjon tas-solubilità tal-kimika f'n-octanol u l-ilma fil-bilanċ (metodu A.8) imfisser ukoll bħala K_{ow}. Il-logaritmu tal-P_{ow} huwa wżat bħala indikazzjoni tal-potenzal tal-kimika għall-biokonċentrazzjoni ta' l-organiżmi akwatiċi.

Il-fażi tal-ħruġ jew tad-dħul huwa ż-żmien li matulu il-ħut jiġu esposti għall-ittestjar kimiku.

Ir-rata kostanti tad-dhul (k_1) hija l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata taz-zieda fil-koncentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar ġo/fuq l-ittestjar tal-ħut (jew tessuti speċifiċi tagħhom) meta l-ħut jkun espost għal dik il-kimika (k_1 huwa msejjaħ fl-ewwel ġurnata).

Il-fażi ta' wara l-ħruġ jew tat-tisfija ta' l-impuritajiet (telf) huwa l-ħin, wara t-trasferiment ta' l-ittestjar tal-ħut mill-mezz li jiġbor fih is-sustanza ta' l-ittestjar għal mezz liberu ta' dik is-sustanza, li matulu t-tisfija (jew it-telf nett) tas-sustanza mill-ħut ta' l-ittestjar (jew it-tessut speċifiku tiegħu) jiġi studjat.

Ir-rata tat-tisfija (telf) kostanti (k_2) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata tat-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar tal-ħut ta' l-ittestjar (jew it-tessuti speċifiċi tiegħu) wara t-trasferiment tal-ħut ta' l-ittestjar mill-mezz liberli jiġbor fih is-sustanza ta' l-ittestjar (k_2 huwa msejjaħ fl-ewwel ġurnata).

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-ITTESTJAR

L-ittestjar jikkonsisti f'żewġ fażijiet: il-fażijiet tal-kxif (uptake) u ta' wara l-kxif (it-tisfija). Matul il-fażi tad-dħul, gruppi separati ta' ħut ta' speċi waħda huma murija mill-inqas għal żewġ konċentrazzjonijiet tas-sustanza ta' l-ittestjar. Imbagħad jiġu trasferiti għall-mezz liberu tas-sustanza ta' l-ittestjar għall-fażi tat-tisfija. Il-fażi tat-tisfija hija dejjem neċessarja sakemm id-dħul tas-sustanza matul il-fażi tad-dħul kienet insinifikanti (eż. il-BCF huwa inqas minn 10). Il-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar ġo/fuq il-ħut (jew it-tessut speċifiku tieghu) jiġi segwit miż-żewġ fażijiet ta' l-ittestjar. Biż-żieda taż-żewġ konċentrazzjonijiet ta' l-ittestjar, grupp ta' kontroll tal-ħut huwa miżmum taħt kondizzjonijiet identiċi ħlief għall-assenza tas-sustanza ta' l-ittestjar, sabiex jiġu konnessi effetti avversi possibbli osservati fl-ittestjar tal-bijokonċentrazzjoni għall-grupp ta' kontroll li jaqbel u sabiex jiġu miksuba konċentrazzjonijiet ta' l-isfond tas-sustanza ta' l-ittestjar.

▼B

Il-faŻi tad-dħul titħaddem għal 28-il ġurnata sakemm jintwera li l-bilanċ intlaħaq qabel. Predizzjoni tat-tul tal-faŻi tad-dħul u l-ħin għall-istat stabbli tista' tiġi magħmula mill-ekwazzjoni fl-Anness 3. Il-perjodu tat-tisfija jiġi mibdi mbagħad billi l-ħut jiġi trasferit lill-istess mezz iŻda mingħajr is-sustanza ta' l-ittestjar ġo reċipjent nadif ieħor. Fejn hu possibbli l-fattur tal-biokonċentrazzjoni huwa kalkulat preferibbilment kemm bħala l-proporzjon (BCF_{SS}) tal-konċentrament tal-ħut (C_f) u fl-ilma (C_w) għal dik li tidher stat stabbli u bħala fattur kinetiku tal-bijokonċentrazzjoni (BCF_k) bħala l-proporzjon tar-rati kostanti tad-dħul (k_1) u t-tisfija (k_2) li jassumu l-kinetiċi ta' l-ewwel ordni. Jekk kinetiċi ta' l-ewwel ordni mhumiex ovvjament obduti, mudelli aktar kumplessi għandhom jiġu mpjegati. (Anness 5).

Jekk stat stabbli ma sseħħx fi 28-il ġurnata, il-faŻi ta' l-uptake għandha tiġi estiża sakemm il-stat stabbli tintlaħaq, jew 60 jum, tiġi liema tiġi l-ewwel; il-faŻi tat-tisfija tkun imbagħad mibdija.

Il-kostant tar-rata tad-dħul, it-tisfija (telf) il-kostant tar-rata (jew il-kostanti, fejn mudelli aktar komplessi huma nvoluti), il-fattur tal-biokonċentrazzjoni, u fejn huwa possibbli, l-limiti tal-kunfidenza ta' kull wieħed minn dawn il-parametri huma kalkulati mill-mudell li jiddeskrivi bl-aħjar mod il-konċentrazzjonijiet mkejla tas-sustanza ta' l-ittestjar tal-ħut u l-ilma.

Il-BCF hija msejħa bħala funzjoni ta' l-użien imxarrab totali tal-ħut. Madankollu, għall-għanijiet speċjali, tessuti jew organi speċifiċi (eŻ. muskolu, fwied), jistghu jintużaw jekk il-ħut huwa kbir biŻŻejjed jew jekk il-ħut jista' jinqasam fi frazzjonijiet li jittieklu (maqtugħ fi strixxi) u li ma jittieklux (vixxri). Ladarba, għal ħafna sustanzi organiċi, hemm relazzjoni ċara bejn il-potenzal għall-biokonċentrazzjoni u l-lipophilicity, hemm ukoll relazzjoni korrispondenti bejn il-kontenut tal-lipidu tal-ħut ta' l-ittestjar u l-biokonċentrazzjoni osservata tat-tali ħut. Għalhekk, sabiex dan is-sors ta' varjabilità jiġi mnaqqas fir-riŻultati ta' l-ittestjar għal dawk is-sustanzi b'lipophilicity għolja (jiġifieri b'log tal-P_{ow} > 3), il-biokonċentrazzjoni għandha tiġi espressa skond il-kontenut tal-lipidu miŻjud mal-piŻ tal-ġisem kollu.

Il-kontenut tal-lipidu għandu jiġi determinat fuq l-istess materjal bijoloġiku ladarba huwa wŻat sabiex jiddetermina l-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar, meta possibbli.

1.4. INFORMAZZJONI DWAR IS–SUSTANZA TA' L-ITTESTJAR

Qabel ma jsir l-ittestjar għall-biokonċentrazzjoini, din l-informazzjoni li ġejja għas-sustanza ta' l-ittestjar għandha tkun magħrufa:

— solubilità fl-ilma;

— koeffiċjenti tal-qsim ta' l-octanol-water P_{ow} (indikat ukoll bħala K_{ow}, determinat minn metodu ta' l-HPLC A.8);

— idrolisi;

— fototrasformazzjoni ġo l-ilma determinata taħt illuminazzjoni solari jew illuminazzjoni solari simulata u taħt il-kondizzjonijiet ta' l-illuminazzjoni ta' l-ittestjar għall-bijokonċentrazzjoni (3);

▼B

— tensjoni tal-wiċċ (jiġifieri għall-sustanzi fejn il-logaritmu tal-P_{ow} ma jistax jiġi determinat);

— pressjoni tal-fwar;

— bijodegradibilità lesta (fejn xieraq).

Informazzjoni oħra meħtieġa hija t-tossiċità għall-ispeċi tal-ħut li għandha tintuża fl-ittestjar, preferibbilment l-asintot LC_{50} (jiġifieri indipendenti mill-hin). Metodu analitiku xieraq, ta' reqqa magħrufa, preċiżjoni u sensittività, għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar fis-soluzzjonijiet ta' l-ittestjar u f'materjal bioloġiku għandu jkun disponibbli, flimkien mad-dettalji tal-preparazzjoni tal-kampjun u tal-ħażna. Il-limitu ta' l-iskoperta analitika tas-sustanza ta' l-ittestjar kemm ta' l-ilma kif ukoll tat-tessuti tal-ħut għandhom ukoll jiġu magħrufa. Meta sustanza ta' l-ittestjar bit-tikketta ^{14}C hija użata, il-persentaġġ tar-radjuattività assoċjat ma' l-impuritajiet għandu jiġi magħruf.

1.5. VALIDITÀ TA' L-ITTESTJAR

Il-kondizzjonijiet li jsegwu għandhom japplikaw sabiex l-ittestjar ikun validu:

— il-varjazzjoni tat-temperatura hija inqas minn ± 2 °C,

— il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu maħlul ma jaqax taħt is-60 % tas-saturazzjoni,

— il-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar fil-kmamar hija miżmuma sa l-± 20 % tal-medja tal-valuri mkejla matul il-fażi tad-dħul,

— il-mortalità jew effetti avversi oħra/marda kemm fil-kontroll u fil-kura tal-ħut hija inqas minn 10 % fl-aħħar ta' l-ittestjar; fejn l-ittestjar huwa mġedded fuq ħafna ġimgħat jew xhur, mewt jew effetti avversi fiż-żewġ settijiet tal-ħut għandha tkun inqas minn 5 % kull xahar u ma taqbiżx it-30 % b'kollox.

1.6. KOMPOŻIZZJONIJIET TA' REFERENZA

L-użu ta' kompożizzjonijiet ta' referenza ta' potenzal tal-bijokonċentrazzjoni magħruf ikun bżonnjuż sabiex il-proċedura sperimentali tiġi ċekkjata, meta huwa meħtieġ. Madankollu, sustanzi speċifiċi għadhom ma jistgħux jiġu rakkomandati.

1.7 DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' L-ITTESTJAR

1.7.1. *Apparat*

Għandha tingħata kura sabiex ikun jista' jiġi evitat l-użu tal-materjali, għall-partijiet kollha tat-tagħmir, li jistgħu jħollu, jaqbdu ma' jew ikollhom effett avvers fuq il-ħut. Tankijiet standard rettangulari jew ċilindriċi, magħmula minn materjal kimiku inerti u ta' kapaċità adatta b'konformità mar-rata tal-karga jistgħu jiġu wżati. L-użu ta' tubi tal-plastik artab għandu jiġi mnaqqas. Teflon (R), stainless steel u/jew tubi tal-ħġieġ huma preferibbilment użati. L-esperjenza wriet li s-sustanzi b'koeffiċjenti ta' l-assorbiment għolja, bħall-pyrethroids sintetiċi, ħġieġ silanised jista' jkun meħtieġ. F'dawn is-sitwazzjonijiet it-tagħmir għandu jiġi mormi wara l-użu.

▼B

1.7.2. *Ilma*

L-ilma naturali huwa ġeneralment użat fl-ittestjar u għandu jiġi miksub minn sors mhux ikkontaminat u ta' kwalità uniformi. L-ilma li jitħallat għandu jkun ta' kwalità li għandha tippermetti s-sopravivenza ta' l-ispeċi ta' ħut magħżula għad-dewmien ta' l-akklimazzjoniu perjodi ta' l-ittestjar mingħajr kull apparenza jew imġieba anormali. Idealment, għandu jiġi muri li l-ispeċi għall-ittestjar jistgħu jgħixu, jikbru u jirriproduċu fl-ilma li jitħallat (eż. fil-kultura tal-laboratorju jew l-ittestjar tat-tossità taċ-ċiklu tal-ħajja). L-ilma għandu jkun karatterizzat mill-inqas minn pH, twebbis, solidi totali, karbonju organiku totali u, preferibbilment ammonju wkoll, nitrit u alkalinità u, għall-ispeċi marini, s-salinita. Il-parametri li huma importanti għall-aħjar benesseri tal-ħut huma magħrufa kollha, iżda l-Anness 1 jagħti konċentrazzjonijiet massimi rakkomandati ta' numru ta' parametri għal ilmijiet friski u marini ta' l-ittestjar.

L-ilma għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu ta' l-ittestjar. Il-valur tal-pH għandu jkun ta' bejn il-limiti ta' 6,0 sa 8,5, iżda matul l-ittestjar speċifiku għandu jkun bejn il-limiti ta' unitajiet ± 0,5 tal-pH. Sabiex ikun assigurat illi t-taħlit ta' l-ilma ma jinfluwenzax b'mod inkorrett ir-riżultat ta' l-ittestjar (per eżempju, bit-tifsira tas-sustanza ta' l-ittestjar) jew avversament jaffettwa l-eżekuzzjoni ta' l-istokk tal-ħut, kampjuni għandhom jiġu mogħtija kull ftit żmien għall-analiżi. Id-determinazzjoni ta' metalli tqal (eż.. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), anjoni u cations (eż. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pestiċidi (eż. pestiċidi organophosphorous totali u organochlorine totali), karbonju organiku totali u solidi sospiżi għandhom jintagħmlu, per eżempju, kull tlett xhur fejn ilma mħallat huwa magħruf li l-kwalità hija relativament kostanti. Jekk il-kwalità ta' l-ilma ġiet murija bħala kostanti mill-inqas fi żmien sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jkunu inqas frekwenti u l-intervalli miżjuda (eż. kull sitt xhur).

Il-kontenut naturali tal-partikola wkoll il-karbonju organiku totali (TOC) ta' l-ilma tat-taħlit għandu jkun baxx kemm jista' jkun sabiex jiġi evitat l-assorbiment tas-sustanza ta' l-ittestjar għall-oġġett organiku li jista' jnaqqas il-biodisponibilità tiegħu (4). Il-valur massimu aċċettabbli huwa ta' 5 mg/l għall-oġġett partikolari (oġġett niexef/xott, li ma jagħddix il-filtru ta' 0,45 μm) u 2 mg/l għall-karbonju totali organiku (ara Anness 1). Jekk hemm bżonn, l-ilma għandu jiġi filtrat qabel l-użu. Il-kontribuzzjoni għall-kontenut organiku tal-karbonju fl-ilma mill-ħut ta' l-ittestjar (eskreta) u mir-residwi ta' l-ikel għandha tkun baxxa kemm jista' jkun. Matul l-ittestjar, il-konċentrazzjoni tal-karbonju organiku fir-reċipjent ta' l-ittestjar ma għandux jaqbeż il-konċentrazzjoni tal-karbonju organiku li joriġina mis-sustanza ta' l-ittestjar u, jekk ikun użat, l-aġent li jitħallat b'iktar minn 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3. *Soluzzjonijiet ta' l-ittestjar*

Soluzzjoni ta' l-istokk tas-sustanza ta' l-ittestjar hija preparata f'konċentrazzjoni adattata. Is-soluzzjoni ta' l-istokk għandha preferibbilment tiġi preparata billi sempliċiment tkun imħallta u mċaqalqa s-sustanza ta' l-ittestjar fl-ilma li jitħallat. L-użu ta' solventi jew jew li jixterdu (aġenti li jitħalltu) ma huwiex rakkomandat; madankollu dan jista' jseħħ f'xi okkażjonijiet sabiex tkun prodotta soluzzjoni ta' l-istokk ikkonċentrata xierqa. Solventi li jistgħu jintużaw huma ethanol, methanol, eteru ethylene glikol monomethyl, eteru etheylene glikol dimethyl, dimethylformamide u glikol triethylene. Sustanzi li jixterdu li jistgħu jintużaw huma Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % u HCO-40. Kura għandha tingħata meta jintużaw aġenti lesti bijodigradabbli ladarba dawn jistgħu jikkawżaw problemi bit-tkabbir batteriku fl-ittestjar li jagħaddi minnu. Is-sustanza ta' l-ittestjar jista' tiġi tikettata bir-radjazzjoni u għandha tkun ta' l-akbar purità (eż. preferibbilment > 98 %).

▼B

Għat-testijiet li jgħaddi minnhom, sistema li kontinwament tiddispensa u tħallat soluzzjoni ta' l-istokk tas-sustanza ta' l-ittestjar (eż. pompa tal-miter, taħlit proporzjonali, sistema li tissatura) hija meħtieġa sabiex tikkunsinna l-konċentrazzjonijiet ta' l-ittestjar tal-kmamar ta' l-ittestjar. Mill-inqas ħames sostituzzjonijiet tal-volum minn kull kamra ta' l-ittestjar kull ġurnata huma permessi. Il-mod li jgħaddi minnu għandu jkun preferut, iżda fejn dan m'huwiex possibbli (eż. fejn l-organiżmi ta' l-ittestjar huma avversament affettwati) teknika semistatika tista' tintuża ladarba l-kriterji tal-validità jkunu sodisfatti. Ir-rati li jimxu/jgħaddu tas-soluzzjonijiet ta' l-istokk u l-ilma tat-taħlit għandhom it-tnejn ikunu kontrollati 48-il siegħa qabel u mbagħad mill-inqas kuljum matul l-ittestjar. F'dan il-kontroll tad-determinazzjoni tar-rata li tgħaddi ta' kull kamra ta' l-ittestjar hija inkluża u assigurata li ma tvarjax b'aktar minn 20 % jew ġo inkella bejn il-kmamar.

1.7.4. *Selezzjoni ta' speċi*

Kriterji importanti fis-selezzjoni ta' l-ispeċi huma li huma dejjem lesti disponibbli, jistgħu jitkisbu f'daqsijiet konvenjenti u jistgħu jkunu b'mod sodisfaċenti mantenuti fil-laboratorju. Kriterji oħra sabiex jiġu selezjonati l-ispeċi tal-ħut jinkludu importanza rekreazzjonali, kummerċjali, ekoloġika wkoll sensittività komparattiva, l-użu li rnexxa qabel, eċċ.

Speċi rakkomandati għall-ittestjar huma stabbiliti fl-Anness 2. Speċi oħrajn jistgħu jintużaw iżda il-proċedura ta' l-ittestjar jista' jkollha tiġi xierqa sabiex jingħataw kondizzjonijiet xierqa ta' l-ittestjar. Ir-razzjonal għas-selezzjoni ta' l-ispeċi u l-metodu sperimentali għandu jkun irrapportat f'dan il-każ.

1.7.5. *Is-sehem tal-ħut*

Akklimatizza il-popolazzjoni ta' l-istokk tal-ħut mill-inqas għal ħmistax fl-ilma fit-temperatura ta' l-ittestjar u għalef fuq dieta suffiċjenti u ta' l-istess tip li jintuża waqt l-ittestjar.

Wara perjodu ta' 48-il siegħa jissetiljaw, l-imwiet huma rreġistrati u l-kriterji li ġejjin huma applikati:

— imwiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: jintrema n-numru sħiħ tal-ħut,

— imwiet ta' bejn il-5 u l-10 % tal-popolazzjoni f'sebat-ijiem: akklimatizza għal sebat ijiem oħra,

— imwiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat-ijiem: taċċetta l-grupp/numru ta' ħut – jekk ikun hemm aktar minn 5 % imwiet matul it-tieni sebat-ijiem tarmi il-grupp kollu.

Tassigura li l-ħut użat fl-ittestjar huma liberi minn mard u a anormalitajiet osservabbli. Skarta kull ħut infettat/marid. Il-ħut ma għandux jirċievi trattament għall-mard fil-ħmistax ta' qabel l-ittestjar, jew matul l-ittestjar.

▼B

1.8. EŻEKUZZJONI TA' L-ITTESTJAR

1.8.1. *Ittestjar preliminari*

Jista' jkun utli li jitmexxa speriment preliminari sabiex jittejbu l-kondizzjonijiet ta' l-ittestjar ta' l-ittestjar definittiv, eż. selezzjoni tal-konċentrazzjoni(ijiet) tas-sustanza ta' l-ittestjar, dewmien tad-dħul u fażijiet tat-tisfija.

1.8.2. *Kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni*

1.8.2.1. Dewmien tal-fażi tad-dħul

Tbassir tad-dewmien tad-dħul jista' jinkiseb minn esperjenza prattika (eż. minn studju li sar qabel jew minn kimika dwar l-akkumulazzjoni) jew minn ċerti relazzjonijiet empiriċi li jużaw it-tagħrif jew tas-solubilità ta' l-ilma jew il-koeffiċjent tal-qsim ta' l-octanol/l-ilma tas-sustanza ta' l-ittestjar (ara Anness 3).

Il-fażi ta' l-uptake għandha sseħħ għall-28-il ġurnata sakemm jista' jintwera li l-bilanċ ġie milħuq qabel. Jekk l-istat stabbli ma ntlaħaqx sa 28-il ġurnata, il-fażi ta' l-uptake għandha tiġi estiża, tistabbilixxi aktar miżuri, sakemm l-istat stabbli jiġi milħuq jew 60-il ġurnata, ikun liema jkun l-iqsar.

1.8.2.2. Dewmien tal-fażi tat-tisfija

Perjodu ta' nofs id-dewmien tal-fażi ta' l-uptake hija s-soltu suffiċjentement għal-riduzzjoni xierqa fil-piż tal-ġisem (eż. 95 %) tas-sustanza biex isseħħ (ara Anness 3 għall-ispjegazzjoni ta' l-istima). Jekk il-ħin meħtieġ biex jintlaħaq 95 % tat-telf mhux prattikament twil, li jaqbeż per eżempju darbtejn id-dewmien normali tal-fażi tad-dħul (jiġifieri aktar minn 56-il ġurnata) perjodu iqsar jista' jkun użat (jiġifieri sakemm il-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar hija inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni tal-stat stabbli). Madankollu, għall-sustanzi li għandhom mudelli aktar kumplessi tad-dħul u t-tisfija milli huma rappreżentati minn mudell tal-ħut ta' kumpartiment wieħed, ipprovdi kinetiċi ta' l-ewwel ordni, ippermetti fażijiet tat-tisfija itwal għad-determinazzjoni tal-kostanti tar-rata tat-telf. Il-perjodu jista', madankollu, jkun immexxi mill-perjodu li fuqu l-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar fil-fdal tal-ħut fuq il-limitu ta' l-iskoperta analitika.

1.8.2.3. Numri ta' ħut ta' l-ittestjar

Għażel in-numri ta' ħut għal kull konċentrazzjoni ta' l-ittestjar b'mod li l-minimu ta' erbgħa ħutiet għal kull kampjun huma/huwa disponibbli f'kull kampjun. Jekk poter statistiku ikbar huwa meħtieġ, aktar ħut għal kull kampjun għandu jkun neċessarju.

Jekk ħut adult jintuża, irraporta jekk humiex irġiel jew nisa, jew it-tnejn li jintużaw fl-esperiment. Jekk iż-żewġ sessi huma użati, differenzi fil-kontenut tal-lipidu bejn is-sessi għandu jkun dokumentat li ma għandux sinifikat qabel il-bidu ta' l-espożizzjoni; iġbor flimkien l-ħut irġiel u nisa kollha jista' jkun neċessarju.

▼B

F'xi wieħed mill-ittestjar, il-ħut ta' l-istess piż huwa magħżul, b'mod li l-iżgħar mhumiex iżgħar minn tnejn minn tlieta tal-piż ta' l-ikbar ħut. Kollha għandhom ikunu ta' l-istess sena-klassi u jiġu mill-istess sors. Ladarba l-piż u l-età/ż-żmien ta' ħut jidhru xi kultant li għandhom xi effett sinifikanti fuq il-valuri tal-BCF (1) dawn id-dettalji huma rraportati b'reqqa. Huwa rakkomandat li sub-kampjun ta' l-istokk tal-ħut huma ppeżati qabel l-ittestjar sabiex jiġi stimat il-piż medju.

1.8.2.4. T a g ħ b i j a

Proporzjoni għolja ta' l-ilma mal-ħut jintużaw sabiex tonqos ir-riduzzjoni fis-C_w ikkawżat miż-żieda ta' ħut fil-bidu ta' l-ittestjar u sabiex jiġi evitat it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mħallat. Huwa mportanti li r-rata tat-tagħbija tkun xierqa għall-ispeċi ta' l-ittestjar użat. F'kull każ, rata tat-tagħbija ta' 0,1 sa 1,0 g ta' ħut (wet weight) għal kull litru fil-ġurnata hija normalment rakkomandata. Rati għolja tat-tagħbija jistgħu jkunu użati jekk ikun muri li l-konċ-entrazzjonijiet meħtieġa tas-sustanza ta' l-ittestjar jistgħu jkunu mantnuti/miżmuma f'limiti ta' ± 20 %, u li l-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu mħallat ma jaqax taħt saturazzjoni ta'60 %.

Fl-għażla tar-reġimi xierqa tat-tagħbija, reġistrazzjoni/account ta' l-abitat normali ta' l-ispeċi tal-ħut huwa meħud. Per eżempju, ħut li jgħix fil-qiegħ jista' jirrikjedi qiegħ ta' l-akwarjum ikbar għall-istess volum ta' ilma minn speċi ta' ħut pelaġiku.

1.8.2.5. G ħ a l f

Matul l-akklimazzjoni u l-perjodi ta' l-ittestjar, il-ħut jkunu magħllfa b'dieta xierqa ta' lipidi magħrufa u kontenut totali tal-proteini total protein content, f'ammont suffiċjenti li jżommhom f'kondizzjoni sanitarja u li jmantni l-piż tal-ġisem. Il-ħut huma magħlufa kuljum mill-/permezz tal-perjodi ta' l-akklimazzjoni u l-perjodi ta' l-ittestjar f'livell ta' bejn wieħed u ieħor ta' piż tal-ġisem ta' 1 sa 2 % kull ġurnata; din iżżomm il- konċentrazzjoni tal-lipidu f'ħafna speċi ta' ħut f'livell relattivament kostanti matul l-ittestjar. L-ammont ta' għalf għandu jerġa' jiġi kkalkulat, per eżempju, darba f'ġimgħa, sabiex jiġu mantnuti piż tal-ġisem konsistenti u kontenut tal-lipidu. Għal din il-kalkulazzjoni, il-piż tal-ħut f'kull kamra ta' l-ittestjar jista' jkun estimat mill-piż tal-ħut miġbura l-iktar reċenti f'dik il-kamra. Tiżinx il-ħut li jibqa' fil-kamra.

Ikel mhux mittiekel u l-ħmieġ huma mogħddija minn sifun siphoned kuljum mill-kamri ta' l-ittestjar eżatt wara l-għalf (30-il minuta sa siegħa). Il-kmamar huma miżmuma ndaf kemm jista' jkun matul l-ittestjar sabiex il-konċentrazzjoni tas-sitwazzjoni organika tinzamm baxxa kemm jista' jkun, ladarba l-preżenza tal-karbonju organiku jista' jillimita l-biodisponibilità tas-sustanza ta' l-ittestjar (1).

Ladarba ħafna għalf ġej mill-ikel tal-ħut, l-għalf għandu jiġi analizzat għas-sustanza ta' l-ittestjar. Huwa ukoll mixtieq li l-għalf jiġi analizzat għall-pestiċidi u l-metalli tqal.

▼B

1.8.2.6. Dawl u temperatura

Il-fotoperjodu huwa ġeneralment 12 sa 16-il siegħa u t-temperatura (± 2 °C) għandha tkun xierqa għall-ispeċi ta' l-ittestjar (ara l-Anness 2). It-tip u l-karatteristiċi ta' l-illuminazzjoni għandhom ikunu magħrufa. Kawtiela għandha tkun mogħtija lill-possibbli fototrans-formazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar taħt kondizzjonijiet ta' l-irrad-jazzjoni ta' l-istudju. Illuminazzjoni xierqa għandha tintuża tevita espożizzjoni tal-ħut għal fotoprodotti mhux naturali. F'xi każijiet jista' jkun xieraq li jintuża filtru sabiex tiġi eżaminata/screen out l-irradjazzjoni tal-UV anqas minn 290 nm.

1.8.2.7. Konċentrazzjonijiet ta' l-ittestjar

Il-ħut huwa espost taħt kondizzjonijiet li jagħddi minnhom għal mill-inqas żewġ konċentrazzjonijiet tas-sustanza ta' l-ittestjar fl-ilma. Normalment, l-għola (jew l-għola) konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar hija magħżula li tkun ta' madwar 1 % ta' l-asintot intens tiegħu LC_{50}, u sabiex ikunu mill-inqas ten-fold għola mill-limitu ta' l-iskoperta tagħhom fl-ilma bil-metodu analitiku użat.

L-ogħla konċentrazzjoni ta' l-ittestjar tista' tkun determinata billi tiddividi l-akut 96h LC_{50} bi proporzjon xieraq akut/kroniku (pro-porzjonijiet xierqa għal xi whud mill-kimiċi jistgħu ikunu bejn wieħed u ieħor tlieta sa 100). Jekk ikun possibbli, għażel il-konċen-trazzjoni(jiet) l-oħra b'mod li jiddistingwi ruħu minn dak ta' fuq bil-fattur ta' għaxra 10. Jekk dan mhuwiex possibbli minħabba fil-1 % tal-kriterja ta' l-LC_{50} u l-limitu analitiku, fattur aktar baxx minn 10 jista' jkun użat jew l-użu ta' sustanza ta' l-ittestjar ittikettata ^{14}C għandu jkun ikkunsidrat. L-ebda konċentrazzjoni użata ma għandha tkun għola mis-solubilità tas-sustanza ta' l-ittestjar.

Fejn aġent solubbli huwa użat il-konċentrazzjoni tiegħu ma għandiex tkun ikbar minn 0,1 ml/l u għandha tkun l-istess fir-reċipjenti kollha ta' l-ittestjar. Il-kontribuzzjoni tiegħu, flimkien mas-sustanza ta' l-ittestjar, il-kontenut kollu tal-karbonju organiku fl-ilma ta' l-ittestjar għandu jkun magħruf. Madankollu, kull sforz għandu jiġi magħmul sabiex jiġi evitat l-użu tat-tali materjali.

1.8.2.8. Kontrolli

Kontroll ta' l-ilma tat-taħlit jew jekk relevanti, kontroll li jiġbor ġo fih l-aġent li titħallat should be run miżjud mas-serje ta' l-ittestjar, ladarba kien stabbilit li l-aġent ma għandu l-ebda effett fuq il-ħut. Jekk le, iż-żewġ kontrolli għandhom jitwaqqfu/jiġu stabbiliti.

1.8.3. *Frekwenza tal-miżuri tal-kwalità ta' l-ilma*

Matul l-ittestjar, l-ossiġenu maħlul, TOC, pH u t-temperatura għandhom jitwieżnu fil-kontenuti kollha. Twebbis totali u salinità, jekk relevanti, għandhom ikunu miżurati fil-kontrollijiet u reċipjent fl-għola (l-għola) konċentrazzjoni. Bħala minimu, l-ossiġenu mħallat u s-salinità, jekk relevanti, għandhom ikunu miżurati tlett darbiet fil-bidu, għan-nofs u għall-aħħar tal-perjodu ta' l-uptake– u darba f'ġimgħa fil-perjodu tat-tisfija. TOC għandu jkun miżurat fil-bidu ta' l-ittestjar (24 siegħa u 48 siegħa qabel l-inizjazzjoni ta' l-ittestjar tal-faži ta' l-uptake) qabel iż-żieda tal-ħut u mill-inqas darba f'ġimgħa, kemm matul il-faži ta' l-uptake kif ukoll dik tat-tisfija. It-temperatura għandha tkun miżurara kuljum, il-pH fil-bidu u fl-aħħar ta' kull perjodu u t-twebbis darba f'kull ittestjar. It-temperatura għandha preferibbilment tiġi kkontrollata kontinwament mill-inqas f'reċipjent wieħed.

▼B

1.8.4. *Il-kontroll u l-analiżi tal-ħut u l-ilma*

1.8.4.1. Skeda tal-kontroll tal-ħut u l-ilma

L-ilma mill-kmamar ta' l-ittestjar għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar tittieħed għall-kampjun qabel iż-żieda tal-ħut kemm matul il-fażijiet tad-dħul kif ukoll dik tat-tisfija. Bħala minimu, l-ilma fl-istess ħin tal-ħut u qabel l-għalf. Matul il-fażi tad-dħul, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ta' l-ittestjar huma ddeterminati sabiex tiġi kkontrollata l-konformità bil-kriterja tal-validità.

Il-ħut huwa kkontrollat fuq mill-inqas ħames okkażjonijiet matul il-fażi ta' l-uptake u mill-inqas erbgħa okkażjonijiet matul il-fażi tat-tisfija. Ladarba fuq xi okkażjonijiet għandu tkun diffiċli li tiġi kkalkulata stima preċiża raġonevoli tal-valur tal-BCF ibbażat fuq dan in-numru ta' kampjuni, speċjalment meta minbarra t-tisfija tal-kinetiċi ta' l-ewwel ordni huma ndikati, jista' jkun rakkomandat li jittieħdu kampjuni bi frekwenza għola fiż-żewġ perjodi (ara Anness 4). Il-kampjuni ż-żejda huma miżmuma u analizzati biss jekk ir-riżultati ta' l-ewwel fażi ta' l-analiżi turi li mhijiex adegwata għall-kalkulazzjoni tal-BCF bil-preċiżjoni mixtieqa.

Eżempju ta' skeda aċċettabbli tal-kontrolli huwa mogħti fl-Anness 4. Skedi oħrajn jistgħu jiġu kkalkulati mill-ewwel jużaw valuri oħra assunti tal-P_{ow} sabiex jiġi kkalkulat il-ħin ta' l-espożizzjoni għall-95 % tad-dħul.

It-teħid tal-kampjuni jitkompla matul il-fażi ta' l-uptake sakemm kondizzjoni li ma tinbidilx tiġi stabbilita jew 28-il jum, ikun liema jkun l-iqsar. Jekk l-istat stabbli ma jkunx intlaħaq f'28-il jum kontroll ikompli sakemm stat stabbli jkun intlaħaq jew għal 60 jum, ikun liema jkun l-iqsar. Qabel ma tinbeda l-fażi tat-tisfija l-ħut jiġi trasferit f'tankijiet nodfa.

1.8.4.2. Kontroll u preparazzjoni tal-kampjun

Kampjuni ta' l-ilma għall-analiżi huma miksuba, per eżempju, jmexxi minn ġo sifun minn punt ċentrali fil-kamra ta' l-ittestjar billi tagħddi minn sifun minn tubi inerti minn punt ċentrali. Ladarba la l-filtrazzjoni lanqas billi jinfired il-likwidu mis-solidu ma jidher dejjem jissepara l-frazzjoni mhux bijodisponibbli (speċjalment għall-kimiċi superlipophilic, jiġifieri, dawk il-kimiċi b'log tal-P_{ow} baxxa > 5) (1) (5), il-kampjuni jistgħu ma jkunux suġġetti għal dawk it-tratttamenti.

Minflok, il-miżuri għandhom jittieħdu sabiex it-tankijiet jinżammu nodfa kemm jista' jkun u l-kontenut tal-karbonju organiku totali għandu jiġi kkontrollat kemm matul il-fażijiet ta' l-uptake kif ukoll dik tat-tisfija.

Numru xieraq ta' ħut (normalment minimu ta' erbgħa) jiġu mneħħija mill-kmamar ta' l-ittestjar f'kull ħin tal-kampjuni. Il-ħut kkontrollati huma mlaħalħa malajr mill-ilma, blot "dry", maqtula istantanjament billi jintuża l-metodu l-iktar xieraq u uman, u mbagħad ppeżati.

Huwa preferibbli li jiġu analizzati il-ħut u l-ilma immedjatament wara kontroll sabiex tkun evitata degradazzjoni jew aktar telf u sabiex jiġi kkalkulata l-uptake approssimativ u r-rati tat-tisfija filwaqt li l-ittestjar jitkompla. Analiżi mmedjata tevita ukoll dewmien biex tiddetermina meta plateau jkun intlaħaq.

▼B

Fin-nuqqas ta' analiżi immedjata, il-kampjuni huma maħżuna b'metodu xieraq. Qabel il-bidu ta' l-istudju, l-informazzjoni fuq il-metodu propju tal-ħażna tas-sustanza ta' l- ittestjar partikolari – per eżempju, il-kesħa qawwija, li tinżamm f 4 ºC, id-dewmien tal-ħażna, il-qliegħ, eċċ. huma miksuba.

1.8.4.3. Kwalità ta' metodu analitiku

Ladarba l-proċedura kollha tkun immexxija essenzalment bl-eżattezza, preċiżjoni u sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza ta' l-ittestjar, ikkontrolla permezz ta' esperiment li l-preċiżjoni u r-riproduċibilità ta' l-analiżi kemikali, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza ta' l-ittestjar kemm mill-ilma kif ukoll mill-ħut huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari. Ukoll, ikkontrolla li s-sustanza ta' l-ittestjar mhijiex investigata fl-ilma tat-taħlit użat.

Jekk neċessarju, il-valuri ta' C_w u C_f miksuba mill-ittestjar huma kkoreġuti għall-irkupri u l-valuri ta' l-isfond tal-kontrolli. Il-kampjuni tal-ħut u l-ilma huma mmexxija b'mod li tiġi mnaqqsa l-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw mill-assorbiment mill-proġett/l-għodda tat-teħid tal-kampjuni).

1.8.4.4. Analizi tal-kampjuni tal-ħut

Jekk il-materjali radiolabeled huma użati fl-ittestjar, huwa possibbli li tanalizza għal radio label totali (jiġifieri ġenitur u metaboliti) jew, il-kampjuni jistgħu jitnaddfu sabiex il-kompost tal-ġenitur jista' jiġi analizzat separatament. Ukoll, l-akbar metaboliti jistgħu jkunu karatterizzati f stat stabbli jew fl-aħħar tal-fażi ta' l-uptake, tkun meta tkun l-iktar kmieni. Jekk il-BCF skond residwi radiolabeled totali hija ≥ 1 000 %, tista' tiġi rakkomandata, u ċertament għal ċerti kategoriji ta' kimiċi bħal ma huma il-pestiċidi rakkomandati ħafna, sabiex jidentifikaw u jikkwantifikaw degradati li jirrappreżentaw ≥ 10 % tar-residwi totali fit-tessuti tal-ħut f stat stabbli. Jekk degradati li jirrappreżentaw ≥ 10 % tar-residwi radiolabeled totali fit-tessut tal-ħut huma identifikati u kwantifikati, imbagħad huwa rakkomandat ukoll li jiddentifikaw u jikkwantifikaw id-degradati fl-ilma ta' l-ittestjar.

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar għandha s-soltu tkun determinata għal kull ħuta ndividwali mwieżna. Jekk dan mhux possibbli, il-ġbir tal-kampjuni fkull okkażjoni tat-teħid tal-kampjuni tista' tiġi magħmula iżda l-pooling ma jirrestriġix il-proċeduri statistiċi li jistgħu jiġu appplikati mad/lid-data. Jekk proċedura statistika speċifika u l-poter huma konsiderazzjonijiet importanti, imbagħad numru adegwat ta' ħut sabiex jalloġġa il-proċedura tal-pooling mixtieqa u l-poter għandhom jiġu nklużi fl-ittestjar (6) (7).

Il-BCF għandu jiġi msemmi kemm bħala funzjoni ta-piż mxarrab totali u, għal sustanzi lipholic għolja, bħala funzjoni tal-kontenut tal-lipidu. Il-kontenut tal-lipidu tal-ħut huwa ddeterminat fuq kull okkażjoni tal-kontroll jekk possibbli. Metodi għandhom jintużaw għad-determinazzjoni tal-kontenut tal-lipidu (referenzi 8 u 2 ta' Anness 3). It-teknika ta' l-estrazzjoni tal-Chloroform/methanol tista' tkun rakkomandata bħala metodu standard (9). Il-metodi varji ma jagħtux valuri identiċi (10), għalhekk huwa mportanti li jingħataw id-dettalji tal-metodu użat. Meta possibbli, l-analiżi għal-lipidu għandu jkun magħmul fuq l-istess estrazzjoni bħal dik prodotta għas-sustanza ta' l-ittestjar, ladarba l-lipidi spiss għandhom ikunu mneħħija mill-estrazzjoni qabel ma jkun analizzat kromotografikament. Il-kontenut tal-lipidu tal-ħut (bħal mg/kg użien imxarrab) fl-aħħar ta' l-esperiment ma għandux ivarja minn dak tal-bidu minn iktar minn ± 25 %. Is-solidi perċentwali tat-tessut għandhom ukoll ikunu rrappurtatati sabiex jippermettu l-konversjoni tal-konċentrazzjoni tal-lipidu minn bażi mxarrba għal waħda xotta.

▼B

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR–RIŻULTATI

Il-kurva tad-dħul tas-sustanza ta' l-ittestjar hija miksuba billi tgħaqqad il-ponot tal-konċentrazzjoni tagħha ġo/fuq il-ħut (jew tessuti speċifiċi) fil-fażi tad-dħul kontra l-ħin fuq skali aritmetiċi. Jekk il-kurva laħqet kondizzjoni, jiċifieri, ssir bejn wieħed u ieħor asintotika ma' l-assi tal-ħin, il-kondizzjoni statika tal-BCF_{SS} hija kkalkulata minn:

$$\frac{C_f \text{kondizzjoni stabbli(medja)}}{C_w \text{kondizzjoni stabbli(medja)}}$$

Meta l-ebda stat stabbli ma jkun intlaħaq, jista' jkun possibbli tikkalkula BCF_{SS} ta' preċiżjoni suffiċjenti għal assessjar riskjuż minn "steady-state" bi 80 % ($1{,}6/k_2$) jew 95 % ($3{,}0/k_2$) ta' bilanċ.

Ukoll il-fattur tal-konċentrazzjoni (BCF_k) huwa ddeterminat, bħala l-proporzjon tal-k_1/k_2, l-ewwel żewġ kostanti kinetiċi ta' l-ewwel ordni. Il-kostant tar-rata tat-tisfija (k_2) hija s-soltu determinata mill-kurva tat-tisfija (jiġifieri il-proġett tat-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' l-ittestjar fil-ħut mal-ħin). Il-kostant tar-rata tad-dħul (k_1) huwa mbagħad kkalkulat mogħti k_2 u l-valur ta' Cf li ġej mill-kurva tad-dħul (ara wkoll Anness 5). Il-metodu preferut sabiex tikseb il-BCF_k u l-kostanti tar-rati, il- k_1 u l-k_2, huwa li jintużaw metodi ta' l-istima tal-parametru mhux lineari fuq komputer (11). Inkella, metodi grafiċi jistgħu jintużaw sabiex jikkalkulaw k_1 u k_2. Jekk il-kurva tat-tisfija hija ovvjament mhux l-ewwel ordni, imbagħad mudelli iktar kumplessi għandhom jintużaw (ara referenzi fl-Anness 3) u parir minn espert tal-bijostatistika mfittex.

2.2 INTERPRETAZZJONI TAR–RIŻULTATI

Ir-riżultati għandhom jiġu nterpretati b'kawtela fejn konċentrazzjonijiet miżurati/mkejla tas-soluzzjonijiet ta' l-ittestjar iseħħu f'livelli qrib il-limitu ta' l-iskoperta tal-metodu analitiku.

Dħul definit b'mod ċar u kurvi tat-telf huma indikazzjoni ta' data tal-biokonċentrazzjoni ta' kwalità tajba. Il-varjazzjoni fil-kostanti tad-dħul/t-tisfija bejn iż-żewġ konċentrazzjonijiet ta' l-ittestjar għandha tkun inqas minn 20 %. Differenzi sinifikattivi osservati fir-rati tad-dħul/it-tisfija bejn iż-żewġ konċentrazzjonijiet applikati ta' l-ittestjar għandhom ikunu rreġistrati u spjegazzjonijiet possibbli mogħtija. Ġeneralment il-limitu tal-kunfidenza tal-BCFs minn approċi ta' studji ddisinjati sew ± 20 %.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Ir-rapport ta' l-ittestjar għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

3.1. SUSTANZA TA' L-ITTESTJAR

— natura fiżika u, fejn relevanti, propertajiet fisiokemikali,

— data ta' l-identifikazzjoni kemikali (li jinkludu il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk huwa xieraq),

— jekk ittikettata tar-radjazzjoni, il-posizzjoni preċiża ta' l-atomu(i) u l-persentaġġ tar-radjuattività assoċjata ma' l-impuritajiet.

▼B

3.2. SPEĊI TA' L-ITTESTJAR

— ismijiet xjentifiċi, sforz, sors, xi trattament li sar qabel, akklimazzjoni, żmien, limitu ta' daqs, eċċ.

3.3. IL–KONDIZZJONIJIET TA' L-ITTESTJAR

— ittestja l-proċedura użata (e.ż. li jgħaddi minnha jew semistatika),

— it-tip u l-karatteristiċi ta' l-illuminazzjoni użata u l-fotoperijodu(i),

— id-disinn bi prova (e.ż. in-numru u l-kobor tal-kmamar ta' l-ittestjar, ir-rata tal-bdil tal-volum ta' l-ilma, in-numru tar-repliki, in-numru tal-ħut għal kull replika, in-numru tal-konċentrazzjonijiet ta' l-ittestjar, it-tul tal-ħin biex jiddaħħal il-materjal li jintuża u l-fażijiet tat-tisfija, il-frekwenza tat-teħid tal-kampjuni għall-kampjuni tal-ħut u ta' l-ilma),

— il-metodu tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' l-iskorti u l-frekwenza tar-rinnovament (l-aġent li jagħmel xi ħaġa solubbli, il-konċentrazzjoni tiegħu u l-kontribuzzjoni tiegħu għall-kontenut organiku tal-karbonju ta' l-ilma ta' l-ittestjar għandu jingħata, meta' jiġi wżat),

— il-konċentrazzjonijiet nominali ta' l-ittestjar, il-mezzi tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fil-bastimenti ta' l-ittestjar u l-metodu li bih dawn ġew miksuba,

— l-egħjun ta' l-ilma dilwit, id-deskrizzjoni ta' xi trattament li jsir qabel, ir-riżultati ta' xi dimostrazzjoni ta' l-abbilità tal-ħut ta' l-ittestjar li jgħixu fl-ilma, u l-karatteristiċi ta' l-ilma: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu maħlul, il-livelli tal-kloru residwu (jekk mkejla), il-karbonju organiku totali, is-solidi mdendla, is-salinità tal-mezz ta' l-ittestjar (jekk xieraq) u xi kejl ieħor magħmul,

— il-kwalità ta' l-ilma fil-bastimenti ta' l-ittestjar, il-pH, l-ebusija, it-TOC, it-temperatura u l-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu maħlul,

— informazzjoni ddetaljata fuq l-għalf (per eżempju, it-tip ta' l-ikel, l-egħjun, il-komposizzjoni – għall-anqas tal-kontenut tal-lipidi u tal-proteini jekk possibli, l-ammont mogħti u l-frekwenza),

— informazzjoni fuq it-trattament tal-kampjuni tal-ħut u ta' l-ilma, inklużi d-dettalji tal-preparazzjoni, il-ħażna, il-qligħ u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sostanza ta' l-ittestjar u l-kontenut lipidu (jekk mkejla).

3.4. IR–RIŻULTATI:

— ir-riżulatati minn kwalunkwe studji preliminari magħmula,

— il-mortalità tal-ħut ikkontrollat u l-ħut f'kull kamra ta' l-espożizzjoni u kull aġir li mhux normali li jkun osservat,

— il-kontenut lipidu tal-ħut (jekk id-determinazzjoni fuq l-okkażjoni ta' l-ittestjar),

— il-kurva (inkluża l-informazzjoni mkejla kollha) li turi d-dħul u it-tisfija tal-kimika ta' l-ittestjar fil-ħut, il-ħin għall-istat stabbli,

▼B

— Cf u Cw (b'devjazzjoni u l-marġni standard, jekk xieraq) għall-ħinijiet kollha tat-teħid tal-kampjuni (Cf espressi fi µg/g piż mxarrab (ppm) tal-ġisem kollu jew tat-tessuti speċifikati tagħhom, e.ż. lipidu, u is-Cw fi µg/ml (ppm). Valuri tas-Cw għas-serje tal-kontroll (l-isfond għandu wkoll jiġi rrappurtat),

— il-fattur tal-bijo-konċentrazzjoni ta' l-istat stabbli (BCF_{SS}) u/jew il-fattur tal-konċentrazzjoni kinetika (BCFK) u jekk applikabbli, 95 % limiti tal-fiduċja għall-kwantitajiet li ma jvarjawx tar-rati (telf) għad-dħul jew għat-tisfija (kollha espressi in relazzjoni mal-ġisem sħiħ u l-kontenut lipidu totali, jekk mkejjel, tat-tessut ta' l-annimal jew tat-tessut speċifikat tiegħu), il-limiti tal-fiduċja u d-devjazzjoni standard (kif disponibbli) u l-metodi ta' l-analiżi tal-komputazzjoni/ta' l-informazzjoni għal kull konċentrazzjoni ta' sostanza ta' l-ittestjar użata,

— fejn sostanzi bit-tikketta tar-radjazzjoni huma wżati, u jekk tkun meħtieġa, l-akkumulazzjoni ta' xi sostanzi ffurmati fil-metaboliżmu skoperti tista' tiġi ppreżentata,

— kwalunkwe ħaġa li mhix tas-soltu dwar it-test, kwalunkwe devjazzjoni minn dawn il-proċeduri, u kwalunkwe informazzjoni relevanti oħra.

imminimizza r-riżultati bħala 'mhux skoperti fil-limitu ta' l-iskoperta bl-iżvilupp tal-metodu ta' qabel it-test u d-disinn sperimentali', peress li dawn ir-riżultati ma jistgħux jiġu wżati għal-kalkulazzjonijiet tal-kwantitajiet li ma jvarjawx tar-rati.

4. **REFERENZI**

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp. 117-156.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Non-linear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, pp. 29-390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(1). Analysis of Human jew animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J. F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in "The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulationċ", Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al, (1995). Limn. & Oceanogr. 30, pp. 1099-1105.

(10) Randall R. C., Lee H., Ozretich R. J., Lake J. L. and Pruell R. J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431-1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method- Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

ANNESS 1

Il-karatteristiċi kemikali ta' l-ilma dilwit aċċettabli

	Sostanza	Il-limitu talkonċentrazzjoni
1	Materja f'sura ta' partikolari separati	5 mg/l
2	Karbonju organiku totali	2 mg/l
3	Ammonja mhux jonizzata	1 µg/l
4	Kloru residwu	10 µg/l
5	Pestiċidi tal-fosfru organiku totali	50 ng/l
6	Pestiċidi tal-kloru organiku totali u bi-fenili *polychlorinated*	50 ng/l
7	Kloru organiku totali	25 ng/l
8	Aluminju	1 µg/l
9	Arseniku	1 µg/l
10	Kromju	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Ram	1 µg/l
13	Ħadid	1 µg/l
14	Ċomb	1 µg/l
15	Nikil	1 µg/l
16	Żingu	1 µg/l
17	Kadmju	100 ng/l
18	Merkurju	100 ng/l
19	Fidda	100 ng/l

▼B

ANNESS 2

L-ispeċi tal-ħut irrakkomandati għall-ittestjar

	Speċi rakkomandati	Il-marġni rakkomandata Tat-temperatura ta' l-ittestjar (°C)	It-tul totali rakkomandat ta' l-annimal għall-ittestjar (cm)
(1)	Danio rerio [1] (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) ħut-żebra	20 - 25	3,0 ± 0,5
(2)	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20 - 25	5,0 ± 2,0
(3)	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karpjun Komuni	20 - 25	5,0 ± 3,0
(4)	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) *Ricefish*	20 - 25	4,0 ± 1,0
(5)	Poecilia reticulata (Teleostei, *Poeciliidae) (Peters) Guppy*	20 - 25	3,0 ± 1,0
(6)	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) *Bluegill*	20 - 25	5,0 ± 2,0
(7)	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) salamun tal-kulur	13 - 17	8,0 ± 4,0
(8)	*Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Three-spined stickleback*	18 - 20	3,0 ± 1,0

[1] Meyer A, Orti G. (1993) Proc. Soċjetà Rjali ta' Londra, Serje B, Vol. 252, pġ. 231.

Diversi speċi ta' l-estwarju u tal-baħar ġew użati f'pajjiżi differenti, per eżempju:

Spot	*Leiostomus xanthurus*
Sheepshead minnow	*Cyprinodon variegatus*
Silverside	*Menidia beryllina*
Shiner perch	*Cymatogaster aggregata*
English sole	*Parophrys vetulus*
Staghorn sculpin	*Leptocottus armatus*
Three-spined stikleback	*Gasterosteus aculeatus*
Spnotta	*Dicentracus labrax*
Arġentina	*Alburnus alburnus*

Il-ġbir

Il-ħut ta' l-ilma ħelu mniżżel fit-tabella huwa faċli biex jittrabba u/jew huwa disponibbli b'mod vast matul is-sena, filwaqt li d-disponibbilità ta' l-ispeċi tal-baħar u ta' l-estwarju huwa parzjalment limitat għall-pajjiżi rispettivi. Huma kapaċi li jiġi mrobbi u kkultivat jew fil-farms tal-ħut jew fil-laboratorju, taħt kondizzjonijiet ta' kontroll tal-mard u tal-parassiti, sabiex l-annimal ta' l-ittestjar ikun b'saħħtu u ta' nisel magħruf. Dawn il-ħut huma disponibbli f'ħafna partijiet tad-dinja.

▼B

ANNESS 3

It-tbassir tad-dewmien tal-fażijiet tad-dħul u tat-tisfija

1. *It-tbassir tad-dewmien tal-faži tad-dħul*

Qabel jiġi magħmul it-test, l-istima tal- k_2 u għalhekk xi ftit mill-persentaġġ tal-ħin meħtieġ biex jintlaħaq l-istat stabbli jista' jkun miksub mir-relazzjonijiet empiriċi bejn il-k_2u l-koeffiċjenti tal-qsim ta' l-*n-octanol*/ta' l-ilma (P_{ow}) jew k_2 u s-solubilità milwiema (s).

L-istima tal-k_2 (ġurnata^{-1}) tista' tkun miksuba, per eżempju mir-relazzjonijiet empiriċi li ġejjin (1):

$\log_{10}k_2 = 0{,}414\ \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47\ (r^2 = 0{,}95)$ [ekwazzjoni 1]

Għal relazzjonijiet oħra ara r-referenza 2.

Jekk il-koeffiċjenti tal-qsim (P_{ow}) mhuwiex magħruf, l-istima tista' tkun magħmula (3) mill-għarfien tas-solubilità milwiema (s) tas-sostanza billi tkun użata:

$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862\ \log_{10}(s) + 0{,}710\ (r^2 = 0{,}994)$ [ekwazzjoni 2]

fejn

s = solubilità (moles/l): (n = 36).

Dawn ir-relazzjonijiet japplikaw biss għall-kimiċi bil-valuri tal-logaritmu P_{ow} bejn 2 u 6,5 (4).

Il-ħin biex jintlaħaq xi persentaġġ ta' l-istat stabbli jista' jkun miksub, billi tiġi applikata l-istima tal-k_2, millekwazzjoni ġenerika kinetika li tiddeskrivi d-dħul u t-tisfija (il-kineticiċi ta' l-ewwel ordni):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

Il-ħin biex jintlaħaq xi persentaġġ ta' l-istat stabbli jista' jkun miksub, billi tiġi applikata

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w\ (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[ekwazzjoni 3]}$$

Meta' l-istat stabbli jiġi avviċinat (t->∞), l-ekwazzjoni 3 tista' tiġi mnaqqsa (5) (6) sa:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ or } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Għalhekk $k_1/k_2.C_w$ huwa approċċ għall-konċentrazzjoni fil-ħut bħala stat stabbli ($C_{f,\ s}$).

L-ekwazzjoni 3 tista' tkun transkritta għal:

$$C_f = C_{f,s}\ (1 - e^{-k_2 t}) \text{ or } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[ekwazzjoni 4]}$$

Meta' tiġi applikata l-ekwazzjoni 4, il-ħin biex jintlaħaq xi persentaġġ ta' l-istat stabbli jista' jkun imbassar meta' l-k_2 huwa stimat minn qabel billi tiġi użata l-ekwazzjoni 1 jew 2.

▼B

Bħala linja ta' gwida, l-aħjar tul statistiku tal-faži tad-dħul għall-produzzjoni ta' l-informazzjoni statistikament aċċettabbli (BCF_k) huwa dak il-perjodu li huwa meħtieġ għall-kurva tal-logaritmu tal-konċentrazzjoni tassostanza ta' l-ittestjar fil-ħut immarkata kontra l-ħin lineari biex jintlaħaq il-punt tan-nofs tiegħu, jew $1,6/k_2$, jew 80 % ta' l-istat stabbli imma mhux aktar minn $3,0/k_2$ jew 95 % ta' l-istat stabbli (7).

Il-ħin biex jintlaħqu it-80 % ta' l-istat stabbli huwa (ekwazzjoni 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ or } t_{80} = \frac{1,6}{k_2}$$ [ekwazzjoni 5]

Bl-istess mod il-95 % ta' l-istat stabbli huma:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$ [ekwazzjoni 6]

Per eżempju, it-tul tal-faži tad-dħul ('il fuq) għas-sostanza ta' l-ittestjar bil-logaritmu P_{ow} = 4 jkun (meta' jiġu wżati l-ekwazzjonijiet 1, 5 u 6)

$\log_{10}k_2$ = - 0,414.(4) + 1,47 k_2 = 0,652 $jiem^{-1}$

jew fuq (80 %) = 1,6/0,652, i.e. 2,45 jiem (59 sigħat)

Fuq (95 %) = 3,0/0,652, i.e. 4,60 jiem (110 sigħat)

Bl-istess mod, għas-sostanza ta' l-ittestjar b' s = 10^{-5} mol/l (logaritmu(i) = 5,0), it-tul 'il fuq jkun (meta' jiġu wżati l-ekwazzjonijiet 1, 2, 5 u 6):

$\log_{10}$ (P_{ow}) = 0,862 (- 5,0) + 0,710 = 5,02

$\log_{10}$ K_2 = 0,414 (5,02) + 1,47

k_2 = 0,246 $jiem^{-1}$

Fuq (80 %) = 1,6/0,246, i.e. 6,5 jiem (156 sigħat)

jew fuq (95 %) = 3,0/0,246, i.e. 12,2 jiem (293 sigħat)

B'mod alternattiv, l-espressjoni:

t_{eq} = 6,54 × 10^3 P_{ow} + 55,31 (sigħat)

tista' tiġi użata biex jiġi kkalkolat il-ħin biex jintlaħaq l-istat stabbli effettiv (4).

2. *It-tbassir tat-tul tal-faži tat-tisfija*

It-tbassira tal-ħin meħtieġ biex jiġi mnaqqas il-piż tal-ġisem għal xi persentaġġ tal-konċentrazzjoni inizjali tista' wkoll tiġi miksuba mill-ekwazzjoni ġenerali li tiddeskrivi d-dħul u t-tisfija (il-kinetiċi ta' l-ewwel ordni) (1) (8).

Għall-faži tat-tisfija, C_w huwa assumat li huwa żero. L-ekwazzjoni tista' tkun ridotta għal:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ jew } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

fejn $C_{f,\ o}$ hija l-konċentrazzjoni fil-bidu tal-perjodu tat-tisfija. 50 % tisfija tkun imbagħad milħuqa fil-ħin (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ jew } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

B'mod simili 95 % tisfija għandha tintlaħaq fi:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Jekk 80 % tad-dħul huma wżati għall-ewwel perjodu ($1,6/k_2$) u 95 % telf fil-fażi tat-tisfija (3,0/k2), għalhekk il-fażi tat-tisfija huwa approssimattivament darbtejn it-tul tal-fażi tad-dħul.

Huwa importanti li jkun innotat, madankolllu, li l-istimi huma bbażati fuq is-supposizzjoni li l-iskemi tad-dħul u tat-tisfija ser isegwu l-kinetiċi ta' l-ewwel ordni. Jekk il-kinetiċi ta' l-ewwel ordni huma ovvjament mhux osservati, mudelli aktar kumplessi għandhom jkunu użati (eż. referenza (1)).

Letteratura (ta' l-Anness 3)

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp 309-320.

(2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.

(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785-792.

(6) Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3-19.

▼B

ANNESS 4

Eżempju teoretiku ta' L–Iskeda tat–Teħid tal–Kampjuni għat–Tests tal–Biokonċentrazzjoni tas–Sostanzi bil–Logaritmu p_{Ow} = 4

It-teħid tal-kampjuni tal-ħut	Skeda tal-ħin tal-kampjun		Numru tal-kampjuni ta' l-ilma	Numru tal-ħut għal kull kampjun
	Il-frekwenza minima meħtieġa (ġranet)	Teħid tal-kampjuni addizzjonal i		
Il-fażi tad-dħul	-1 0		2 (*) 2	Iż-żieda ta' 45 sa 80 ħuta
L-ewwel	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
It-tieni	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
It-tielet	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
Ir-raba'	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
Il-ħames	4,7		2	6
Il-fażi tat-tisfija				It-trasferime nt talħut għall-ilma mingħajr kimika ta' l-ittestjar
Is-sitt	5,0	5,3		4 (4)
Is-seba'	5,9	7,0		4 (4)
It-tmien	9,3	11,2		4 (4)
Id-disa'	14,0	17,5		6 (4)

(*) L-ilma kampjun wara li minimu ta' tlett kmamar b'volum huma kkunsinnati.

Il-valuri fil-parentesi huma numri tal-kampjuni (ilma, ħut) li għandhom jittieħdu jekk kampjuni addizzjonali għandhom jiġu magħmula.

NB: L-istima ta' qabel it-test tal-k_2 għal-logaritmu P_{ow} ta' 4,0 huwa 0,652 ġranet $^{\pm 1}$. It-tul totali ta' l-esperiment huwa stabbilit għal 3 × 'il fuq =3 × 4,6 ġranet, i.e. 14 –il ġurnata. Għall-istimar ta' l'fuq irreferi għall-Anness 3.

▼B

ANNESS 5

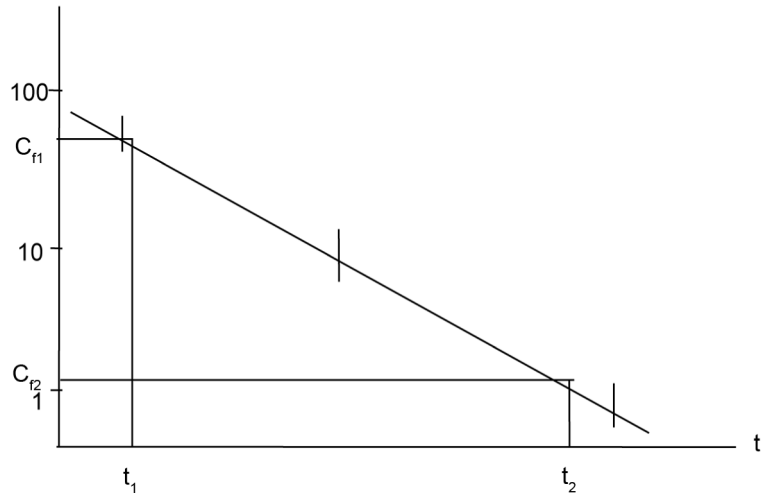
Mudell ta' diskriminazzjoni

Il-maġġoranza ta' l-informazzjoni tal-biokonċentrazzjoni ġiet assumita li hija "raġonevolment" deskritta tajjeb b'mudell sempliċi ta' żewġ kompartamenti/żewġ parametri, kif indikati mill-kurva rettilineari li toqrob għall-punti talkonċentrazzjonijiet fil-ħut, waqt il-fażi tat-tisfija, meta' dawn jiġu mmarkati fuq karta tas-*semi-log*. (Fejn dawn il-punti ma jistgħux jiġu deskritti b'kurva rettilineari allura mudelli aktar kumplessi għandhom ikunu użati, ara, per eżempju, Spacie u Hamelink, referenza 1 fl-Anness 3).

Il–metodu grafikali għad–determinazzjoni tal–kwantitajiet li ma jvarjawx tar–rata tat–tisfija (telf) K_2

Immarka l-konċentrazzjoni tas-sostanza tat-test misjuba f'kull kampjun tal-ħut kontra l-ħin tat-teħid tal-kampjuni fuq karta *semi-log*. Iż-żerżieqa ta' dik il-linja hija il-k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Innota li d-devjazzjonijiet mil-linja d-dritta jistgħu jindikaw skema ta' tisfija aktar kumplessa mill-kinetiċi ta' l-ewwelordni. Il-metodu grafiku jista' jiġi applikat biex ikunu riżolti tipi ta' tisfija li jiddevjaw mill-kinetiċi ta' l-ewwel ordni.

Il–Metodu grafiku għad–Determinazzjoni tal–Kwantitajiet li ma jvarjawx tar–Rata tad–Dħul k_1

Mogħtija l-k_2, ikkalkula l-k_1 kif ġej:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[ekwazzjoni 1]}$$

Il-valur tas-C_f jinqara mill-punt tan-nofs tal-kurva lixxa tad-dħul prodotta mill-informazzjoni meta' l-konċentrazzjoni tal-logaritmu tiġi mmarkata kontra l-ħin (fuq skala aritmetika).

▼B

Il–metodu tal–kompjuter għal–kalkulazzjoni tal–kwantitajiet li ma jvarjawx tar–rati tad–dħul u tat–tisfija (telf)

Il-mezz preferut biex jiġi miksub il-fattur tal-biokonċentrazzjoni u l-kwantitajiet li ma jvarjawx tar-rata l-k_1 u l-k_2 huwa li jiġu wżati metodi ta' parametri ta' stimar mhux lineari fuq kompjuter. Dawn il-programmi jsibu l-valuri għall- k_1 u l-k_2 meta' jkunu mogħtija sett ta' informazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-ħin sekwenzali u l-mudell:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 2]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 3]}$$

fejn t_c= il-ħin fl-aħħar tal-fażi tad-dħul.

Dan l-approċċ jipprovdi stimi tad-devjazzjonijiet *standard* l-k_1 u l-k_2.

Peress illi l-k_2 fil-maġġoranza tal-każijiet jista' jiġi stimat mill-kurva tat-tisfija bi preċiżjoni relattivament għolja, u peress illi korrelazzjoni qawwija teżisti bejn iż-żewġ parametri l-k_1 u l-k_2 jekk stimati simultanjament, jista' jkun irrikkmandat li l-ewwel jiġi kkalkolat il-k_2 mill-informazzjoni tat-tisfija biss, u sussegwentement jiġi kkalkolat il-k_1 mill-informazzjoni tad-dħul billi tiġi użata r-rigressjoni non-lineari.

▼B

C.14. PROVATA' L-IŻVILUPP FIŻ-ŻGĦOŻIJA TAL-ĦUT

1. METODU

Dan il-metodu tal-prova tat-tossiċità fl-iżvilupp huwa replika ta' l-OECD TG 215 (2000).

1.1. DAĦLA

Din il-prova hija ddisinjata biex isir stima ta' l-effetti ta' espożizzjoni fit-tul għall-kimiċi fuq l-iżvilupp ta' ħut żagħżugħ. Hija bbażata fuq metodu, żviluppat u ppruvat permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (1)(2) fl-Unjoni Ewropea, biex issir stima ta' l-effetti tal-kimiċi fuq l-iżvilupp tal-ħut żagħżugħ ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (*Oncorynchus mykiss* – rainbow trout) taħt kondizzjonijiet flow-through. Speċi oħra li huma ddokumentati tajjeb jistgħu jintużaw. Per eżempju, inkisbet esperjenza minn provi ta' l-iżvilupp biż-zebrafish (*Danio rerio*) ([1]) (3)(4) u bir-ricefish (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Ara wkoll id-Daħla Ġenerali l-Parti Ċ.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tagħti effett osservat (LOEC): hija l-iktar konċentrazzjoni baxxa ta' sustanza tal-prova li ġiet ippruvata li fiha s-sustanza hija osservata li għandha effett sinifikattiv (fi $p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha li huma aktar għoljin mil-LOEC għandu jkollhom effett perikoluż daqs jew aktar minn dawk osservati fil-LOEC.

Konċentrazzjoni li ma tagħti l-ebda effett osservat (NOEC): hija l-konċentrazzjoni tal-prova immedjatament taħt il-LOEC.

EC_x: f'dan il-metodu tal-prova hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova li tikkaġuna varjazzjoni fir-rata ta' żvilupp tal-ħut ta' x % meta mqabbla mal-kontrolli.

Rata tat-tagħbija: hija l-piż imxarrab ta' ħut f'volum ta' ilma.

Densità tal-ħżin: hija n-numru ta' ħut f'volum ta' ilma.

Rata ta' żvilupp speċifika għall-ħuta individwali: tesprimi r-rata ta' żvilupp ta' ħuta individwali bbażata fuq il-piż inizjali tagħha.

Rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank: tesprimi r-rata ta' żvilupp medja ta' popolazzjoni ġo tank għal konċentrazzjoni waħda.

Rata ta' żvilupp psewdo speċifika: tesprimi r-rata ta' żvilupp individwali mqabbla mal-piż inizjali medju tal-popolazzjoni tat-tank.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. PRINĊIPJUTAL-METODU TAL-PROVA

Ħut żagħżugħ f'fażi ta' żvilupp esponenzali huwa mqiegħed, wara li jintiżen, f'kompartimenti tal-prova u huwa espost għal firxa ta' konċentrazzjonijiet sotto-letali tas-sustanza tal-prova maħlula fl-ilma preferibbilment taħt kondizzjonijiet flow-through, jew, jekk dan mhux possibbli, taħt kondizzjonijiet semistatiċi (ta' tiġdid statiku) xierqa. It-tul ta' żmien tal-prova huwa ta' 28 jum. Il-ħut huwa mitmugħ kuljum. Ir-razzjon ta' l-ikel huwa bbażat fuq il-piżijiet inizjali tal-ħut u jista' jerġa' jiġi kkalkolat wara 14-il jum. Fit-tmiem tal-prova, il-ħut jerġa' jintiżen. L-effetti fuq ir-rati ta' żvilupp huma analizzati bl-użu ta' mudell tar-rigressjoni sabiex issir stima tal-konċentrazzjoni li tikkaġuna varjazzjoni fir-rata ta' żvilupp ta' x %, i.e. EC_x (eż. EC_{10}, EC_{20}, jew EC_{30}). Alternattivament, id-data tista' titqabbel mal-valuri tal-kontroll sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tagħti effett osservat (LOEC) u għalhekk il-konċentrazzjoni li ma tagħti l-ebda effett osservat (NOEC).

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAL-PROVA

Ir-riżultati tal-prova ta' tossiċċità akuta (ara l-metodu tal-prova Ċ1). Dan jimplika li s-solubilità fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza tal-prova huma magħrufa u li metodu analitiku u ta' min joqgħod fuqu għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis- soluzzjonijiet tal-prova bi preċiżjoni u b'limitu ta' osservazzjoni magħrufa u rraportati huwa disponibbli.

Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali, purità tas-sustanza, stabbiltà fl-ilma u fid-dawl, pK_a, P_{ow} u riżultati tal-prova għal bijodigradibilità fil-pront (ara l-metodu tal-prova Ċ.4).

1.5. VALIDITÀTAL–PROVA

Sabiex il-prova tkun valida għandhom japplikaw il-kondizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità fil-kontroll(i) ma jistax jeċċedi l-10 % fit-tmiem tal-prova,

— il-piż medju tal-ħut fil-kontroll(i) għandu jkun żdied biżżejjed biex jippermetti l-osservazzjoni tal-varjazzjoni minima tar-rata ta' żvilupp li hi meqjusa bħala sinifikattiva. Prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (2) uriet li għal ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout) il-piż medju ta' ħut fil-kontrolli żdied mill-inqas bin-nofs (i.e. 50 %) tal-piż inizjali medju tagħhom fmedda ta' 28 jum, eż. piż inizjali: 1 g/ħut (= 100 %), piż finali wara 28 jum: > 1,5 g/ħut (≥ 150 %),

— il-konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul kienet mill-inqas 60 % tal-valur ta' saturazzjoni ta' l-arja (ASV) matul il-prova,

— it-temperatura ta' l-ilma m'għandhiex tvarja b'aktar minn ± 1 °C bejn il-kompartimenti tal-prova fxi ħin partikolari matul il-prova u għandha tinżamm f firxa ta' 2 °C fil-firxiet ta' temperatura speċifikati għall-ispeċi tal-prova (l-Appendiċi 1).

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL–PROVA

1.6.1. **Apparat**

Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

— metri ta' l-ossiġnu u tal-pH;

▼B

— tagħmir għad-determinazzjoni ta' l-ebusija u l-alkalinità ta' l-ilma;

— tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment moniturjar kontinwu;

— tankijiet magħmula minn materjal li huwa inert għall-kimika u ta' kapaċità adattata skond it-tagħbija u d-densità tal-ħżin rakkomandati (ara it-taqsima 1.8.5 u l-Appendiċi 1);

— bilanċ preċiż kif xieraq (i.e. preċiż sa ± 0,5 %).

1.6.2. **Ilma**

Kull ilma li fih l-ispeċi tal-prova turi sopravivenza fit-tul u żvilupp adattat jista' jintuża bħala ilma tal-prova. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tal-prova. Il-pH ta' l-ilma għandu jkun fil-firxa ta' 6,5 sa 8,5, imma matul prova partikolari għandu jkun f'firxa ta' ± 0,5 unitajiet tal-pH. Ebusija ogħla minn 140 mg/l (bħala $CaCO_3$) hija rakkomandata. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma għat-taħlit ma jaffettwax ir-riżultati tal-prova b'mod eċessiv (per eżempju billi jbiddel il-karattru ġenerali tas-sustanza tal-prova), għandhom jittieħdu kampjuni f'intervalli għall-analiżi. Tiqjis ta' metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd u Ni), anjoni u katjoni maġġuri (eż. Ca, Mg, Na, K, Cl u SO_4), pestiċidi (eż. pestiċidi ta' l-organofosforu totali u ta' l-organoklorin totali), karbonju organiku totali u solidi f'forma ta' suspensjoni għandu jsir, per eżempju, kull tliet xhur fejn l-ilma għat-taħlit huwa magħruf li hu ta' kwalità relattivament kostanti. Jekk il-kwalità ta' l-ilma intweriet li kienet konstanti matul ta' l-inqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jsiru inqas spiss u l-intervalli jiġu estiżi (eż. kull sitt xhur). Xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma għat-taħlit li huwa aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2.

1.6.3. **Soluzzjonijiet tal-prova**

Soluzzjonijiet tal-prova tal-konċentrazzjonijiet magħżula huma preparati billi soluzzjoni tal-ħżin tiġi mħallta ma' l-ilma.

Is-soluzzjoni tal-ħżin għandha preferibbilment tkun preparata sempliċiment billi s-sustanza tal-prova tiġi mħallta jew aġitata fl-ilma għat-taħlit bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. tħawwid jew ultrasonikazzjoni). Kolonni ta' saturazzjoni (kolonni ta' solubilità) jistgħu jintużaw biex tinkiseb soluzzjoni konċentrata tal-ħżin adattata.

L-użu ta' solventi jew ta' aġenti li jiffaċilitaw is-solubbilità (dispersants) jista' jkun meħtieġ f'xi każijiet biex tkun magħmula soluzzjoni tal-ħżin ta' konċentrazzjoni adattata. Eżempji ta' solventi adattati huma aċeton, etanol, metanol, dimethylsulfoxide, dimethylformamide u triethyleneglycol. Eżempji ta' aġenti li jiffaċilitaw is-solubbilità (dispersants) adattati huma Cremophor RH40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % u HCO-40. Attenzjoni għandha tittieħed meta jkunu qed jintużaw aġenti li huma faċilment bijodigradabbli (eż. aċeton) u/jew komposti li huma volatili ħafna għax dawn jistgħu jikkaġunaw problemi bit-tkattir ta' batterja fil-provi flow-through. Meta jintuża aġent li jiffaċiltà s-solubbilità dan m'għandux jkollu effetti sinifikattivi fuq l-iżvilupp tal-ħut u l-inqas effetti negattivi viżibbli fuq il-ħut żagħżugħ kif svelat b'kontroll li juża s-solvent biss.

▼B

Għal provi flow-through, hija meħtieġa sistema li kontinwament tqassam u tħallat bl-ilma s-soluzzjoni tal-ħżin tas-sustanza tal-prova (eż. pompa li tkejjel u tqassam bil-miter, tagħmir li jħallat is-sustanza ma' l-ilma b'mod proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) biex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet lill-kompartimenti tal-prova. Ir-rati ta' ċaqliq tas-soluzzjonijiet tal-ħżin u ta' l-ilma għat-taħlit għandhom jiġu kkontrollati f'intervalli, preferibbilment ta' kuljum, matul il-prova u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul il-prova. Prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (2) uriet li, għal ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), frekwenza tat-tneħħija ta' l-ilma matul il-prova ta' 6 litri/g ta' ħut/jum hija aċċettabbli (ara it-taqsima 1.8.2.2).

Għal provi semi-statiċi (ta' tiġdid), il-frekwenza ta' tiġdid tal-likwidu tiddependi fuq l-istabbiltà tas-sustanza tal-prova, imma tiġdid ta' kuljum ta' l-ilma huwa rakkomandat. Jekk, minn provi ta' stabbiltà preliminarji (ara t-taqsima 1.4), il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova ma tkunx stabbli (i.e. barra mill-firxa ta' 80-120 % tal konċentrazzjoni nominali jew taqa' inqas minn 80 % tal-konċentrazzjoni inizjali meqjusa) matul il-perjodu ta' tiġdid, għandha tingħata konsiderazzjoni għall-użu ta' prova flow-through.

1.6.4. **Għażla ta' l-ispeċi**

L-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (*Oncorhynchus mykiss* – rainbow trout) huwa l-ispeċi rakkomandat għal din il-prova peress li ħafna mill-esperjenza kienet akkwistata minn prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) b'dan l-ispeċi (1) (2). Madankollu, speċi oħra li huma ddokumentati tajjeb jistgħu jintużaw imma l-proċedura tal-prova għandha mnejn ikollha tiġi adattata biex tipprovdi kondizzjonijiet tal-prova adattati. Per eżempju, esperjenza hija wkoll disponibbli biż-zebrafish (*Danio rerio*) (3) (4) u r-ricefish (medaka, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7). Ir-raġuni fundamentali għall-għażla ta' l-ispeċi u tal-metodu esperimentali għandhom jiġu rraportati f'dan il-każ.

1.6.5. **Żamma tal-ħut**

Il-ħut tal-prova għandu jiġi magħżul minn popolazzjoni ta' stokk wieħed, preferibbilment mill-istess wild, li tkun ilha miżmuma għal mill-inqas ġimagħtejn qabel il-prova taħt kondizzjonijiet ta' kwalità ta' l-ilma u ta' illuminazzjoni simili għal dawk użati fil-prova. Għandhom jingħataw razzjon minimu ta' ikel ta' 2 % tal-piż tal-ġisem kuljum u preferibbilment ta' 4 % tal-piż tal-ġisem kuljum matul il-perjodu taż-żamma u matul il-prova.

Wara perjodu ta' stabbilizzazzjoni ta' 48 siegħa, l-imwiet jiġu reġistrati u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

— imwiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-grupp intier jiġi mwarrab,

— imwiet ta' bejn il-5 % u l-10 % tal-popolazzjoni: akklimatizzazzjoni għal sebat ijiem addizjonali, jekk aktar minn 5 % mortalità matul it-tieni sebat ijiem, il-grupp intier jiġi mwarrab,

— imwiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: aċċetta l-grupp.

Il-ħut m'għandux jirċievi trattament għall-mard fil-ġimagħtejn ta' qabel il-prova, jew matul il-prova.

▼B

1.7. DISINN TAL-PROVA

L-“ippjanar tal-prova” huwa relatat ma' l-għażla tan-numru u ta' l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tal-prova, in-numru ta' rankijiet għal kull livell ta' konċentrazzjoni u n-numru ta' ħut f'kull tank. Idealment, id-disinn tal-prova għandu jkun magħżul skond:

— l-għan ta' l-istudju;

— il-metodu ta' analiżi ta' l-istatistika li ser jintuża;

— id-disponibbiltà u l-ispiża tar-riżorsi esperimentali.

Il-prospett ta' l-għan għandu, jekk hu possibbli, jispeċifika l-qawwa ta' l-istatistika li fiha ammont partikolari ta' differenza fid-daqs (eż. fir-rata ta' żvilupp) huwa meħtieġ biex jiġi osservat jew, alternattivament, il-preċiżjoni li biha l-EC_x (eż. fejn x = 10, 20, jew 30, u preferibbilment mhux inqas minn 10) hija meħtieġa biex tkun stmata. Mingħajr dan, ma tistax tingħata preskrizzjoni ferma tad-daqs ta' l-istudju.

Huwa importanti li jingħaraf li d-disinn li huwa l-aħjar (jagħmel l-aħjar użu mir-riżorsi) għall-użu ma' metodu wieħed ta' analiżi ta' l-istatistika mhuwiex neċessarjament l-ottimu għall-użu ma' ieħor. Id-disinn rakkomandat għall-istima ta' LOEC/NOEC għalhekk ma jkunx l-istess bħal dak rakkomandat għal analiżi bir-rigressjoni.

F'għadd kbir ta' każijiet, analiżi bir-rigressjoni hija preferibbli minn analiżi tal-varjanza, għal raġunijiet iddiskutati minn Stephan u Rogers (8). Madankollu, meta ma jinstab l-ebda mudell tar-rigressjoni adattat (r_2 < 0,9) in-NOEC/LOEC għandhom jintużaw.

1.7.1. **Disinn għal analiżi bir-rigressjoni**

Il-konsiderazzjonijiet importanti fid-disinn tal-prova li ser tiġi analizzata bir-rigressjoni huma:

— Huwa meħtieġ li l-konċentrazzjoni li tagħti effett (eż. $EC_{10, 20, 30}$) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet li fiha l-effett tas-sustanza tal-prova huwa ta' interess, ikunu koperti mill-konċentrazzjonijiet inklużi fil-prova. Il-preċiżjoni li biha jistgħu jsiru l-istimi tal-konċentrazzjonijiet li jagħtu effett, tkun l-aqwa meta l-konċentrazzjoni li tagħti effett tkun fin-nofs tal-firxa ta' konċentrazzjonijiet ppruvati. Prova preliminarja biex tinstab il-firxa tista' tkun ta' għajnuna biex jintgħażlu l-konċentrazzjonijiet tal-prova xierqa.

— Biex ikun possibbli li jsir mudellar sodisfaċenti ta' l-istatistika, il-prova għandha tinkludi mill-inqas tank tal-kontroll wieħed u ħames tankijiet addizjonali b'konċentrazzjonijiet differenti. Fejn xieraq, meta jintuża aġent li jiffaċilità s-solubbilità, barra mis-serje tal-prova għandu jsir kontroll wieħed li jkun jinstab fih dan l-aġent fl-iktar konċentrazzjoni għolja li ġiet ppruvata (ara t-taqsimiet 1.8.3 u 1.8.4).

— Serje ġeometrika jew logaritmika xierqa (9) (ara l-Appendiċi 3) tista' tintuża. L-ispazjar logaritmiku tal-konċentrazzjoni tal-prova għandha tkun preferuta.

▼B

— Jekk aktar minn sitt tankijiet huma disponibbli, it-tankijiet addizjonali għandhom jew jintużaw biex jipprovdu replikazzjoni jew ikunu distribwiti mal-firxa tal-konċentrazzjonijiet sabiex jiffaċilitaw spazjar eqreb tal-livelli. Kemm il-waħda kif ukoll l-oħra minn dawn il-miżuri huma ugwalment mixtieqa.

1.7.2. **Disinn għall-istima ta' NOEC/LOEC bl-użu ta' l-analiżi tal-varjanza (ANOVA)**

Preferibbilment għandu jkun hemm tankijiet replikati f'kull konċentrazzjoni, u l-analiżi ta' l-istatistika għandha tkun fil-livell tat-tank (10). Mingħajr tankijiet replikati, ma tista' ssir l-ebda konċessjoni għall-varjabilità bejn it-tankijiet aktar minn dik dovuta għall-ħut individwali. Madankollu, l-esperjenza uriet (11) li l-varjabilità bejn it-tankijiet kienet żgħira ħafna meta mqabbla mal-varjabilità ġot-tank (i.e. bejn il-ħut) fil-każ eżaminat. Għalhekk alternattiva li hi relattivament aċċettabbli hi li ssir analiżi ta' l-istatistika fil-livell tal-ħut individwali.

Konvenzjonalment, jintużaw mill-inqas ħames konċentrazzjonijiet tal-prova f'serje ġeometrika b'fattur li preferibbilment ma jeċċedix it-3,2.

Ġeneralment, meta jsiru provi b'tankijiet replikati, in-numru ta' tankijiet tal-kontroll replikati u għalhekk in-numru ta' ħut għandu jkun id-doppju tan-numru f'kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova, li għandhom ikunu ta' daqs ugwali (12) (13) (14). Min naħa l-oħra, fin-nuqqas ta' tankijiet replikati, in-numru ta' ħut fil-grupp tal-kontroll għandu jkun l-istess bħan-numru f'kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova.

Jekk l-ANOVA għandha tkun bbażata fuq it-tankijiet minflok fuq il-ħut individwali (li jkun jinvolvi jew l-immarkar individwali tal-ħut jew l-użu ta' rati ta' żvilupp "psewdo" speċifiċi (ara t-taqsima 2.1.2)), hemm il-ħtieġa li jkun hemm biżżejjed replikazzjoni ta' tankijiet biex id-devjazzjoni standard ta' "tankijiet fil-konċentrazzjonijiet" tkun tista' tiġi determinata. Dan ifisser li l-gradi ta' ħelsien għall-iżbalji fl-analiżi tal-varjanza għandhom ikunu mill-inqas 5 (10). Jekk il-kontrolli biss huma replikati, hemm il-periklu li l-varjabilità fl-iżbalji tkun preġudikata għax għandha mnejn tiżdied skond il-valur medju tar-rata ta' żvilupp li ssemmiet. Peress li r-rata ta' żvilupp x'aktarx tonqos meta l-konċentrazzjoni tiżdied, dan ikollu tendenza li jwassal għal stima ogħla tal-varjabilità.

1.8. PROĊEDURA

1.8.1. **Għażla u użin tal-ħut tal-prova**

Huwa importanti li l-varjazzjoni fil-piż tal-ħut fil-bidu tal-prova tiġi mnaqqsa kemm jista' jkun. Firxiet ta' daqs adattati għall-ispeċi differenti li huma rakkomandati għall-użu f'din il-prova jingħataw fl-Appendiċi 1. Għall-grupp kollu ta' ħut użat fil-prova, il-firxa ta' piżijiet individwali fil-bidu tal-prova għandha idealment tinżamm fil-± 10 % tal-piż medju aritmetiku u, f'kull każ, m'għandux jeċċedi l-25 %. Huwa rak komandat li sottokampjun ta' ħut jiġi peżat qabel il-prova sabiex issir stima tal-piż medju.

▼B

L-ikel għandu jinżamm mill-popolazzjoni tal-ħżin għal 24 siegħa qabel ma tibda l-prova. Il-ħut għandu imbagħad jintgħażel saltwarjament. Bl-użu ta' anestetiku ġenerali (eż. soluzzjoni fl-ilma ta' 100 mg/l tricaine methane sulphonate (MS 222) newtralizzata bi żieda ta' żewġ partijiet bikarbonat tas-sodju għal kull parti ta' MS 222), il-ħut għandu jintiżen individwalment bħala piż imxarrab (ixxugat) bil-preċiżjoni mniżżla fl-Appendiċi 1. Dawk il-ħut li l-piż tagħhom ikun fil-firxa maħsuba għandhom jinżammu u għandhom imbagħad jiġu mqassma b'mod saltwarju bejn il-reċipjenti tal-prova. Il-piż imxarrab totali tal-ħut f'kull reċipjent tal-prova għandu jiġi reġistrat. L-użu ta' anestetiċi u bl-istess mod l-immaniġġjar tal-ħut (inkluż l-ixxugar u l-użin) jista' jikkaġuna tensjoni u ħsara lill-ħut żagħżugħ, b'mod partikolari lil dawk l-ispeċi ta' daqs żgħir. Għalhekk l-immaniġġjar ta' ħut żagħżugħ għandu jsir bl-akbar attenzjoni biex jiġi evitat li l-annimali tal-prova tinħolqilhom tensjoni u ħsara.

Il-ħut jerġgħu jintiżnu fil-jum 28 tal-prova (ara t-taqsima 1.8.6). Madankollu, jekk ikun meqjus li hu meħtieġ li jerġa' jiġi kkalkolat ir-razzjon ta' l-ikel, il-ħut jista' jerġa' jintiżen fil-jum 14 tal-prova (ara t-taqsima 1.8.2.3). Metodu ieħor bħall-metodu fotografiku jista' jintuża biex jiġi stabbilit it-tibdil fid-daqs tal-ħut li fuq il-bażi tiegħu r-razzjonijiet ta' l-ikel jistgħu jiġu aġġustati.

1.8.2. **Kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.8.2.1. *Tul ta' żmien*

It-tul ta' żmien tal-prova hi ≥ 28 jum.

1.8.2.2. *Rati tat-tagħbija u densitjiet tal-ħżin*

Huwa importanti li r-rata tat-tagħbija u d-densità tal-ħżin huma xierqa għall-ispeċi tal-prova użati (ara l-Appendiċi 1). Jekk id-densità tal-ħżin tkun għolja wisq, allura jkun hemm tensjoni minħabba fl-iffullar esaġerat li jirriżulta f'rati ta' żvilupp imnaqqsa u possibbilment fil-mard. Jekk tkun baxxa wisq, tista' tikkaġuna mġieba territorjali li tista' wkoll taffettwa l-iżvilupp. F'kull każ, ir-rata tat-tagħbija għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul ta' mill-inqas 60 % ASV tista' tinżamm mingħajr arjazzjoni. Programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (3) wera li, għall-ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), rata tat-tagħbija ta' 16 il-ħuta ta' dan l-ispeċi ta' 3-5 g f'volum ta' 40-litru hija aċċettabbli. Il-frekwenza rakkomandata għat-tneħħija ta l-ilma matul il-prova hija ta' 6 litri/g ta' ħut/jum.

1.8.2.3. *Tmigħ*

Il-ħut għandhom jiġu mitmugħa b'ikel xieraq (l-Appendiċi 1) b'rata suffiċjenti li tikkaġuna rata ta' żvilupp aċċettabbli. Għandha tittieħed attenzjoni biex jiġi evitat l-iżvilupp ta' mikrobi u d-dardir ta' l-ilma. Għall-ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), rata ta' 4 % tal-piż tagħom tal-ġisem kuljum għandha x'aktarx tissodisfa dawn il-kondizzjonijiet (2)(15)(16)(17). Ir-razzjon ta' kuljum jista' jitqassam f'żewġ porzjonijiet indaqs u jingħata lill-ħut f'żewġ ikliet kuljum, imbegħdin b'ta' l-inqas ħames sigħat. Ir-razzjon huwa bbażat fuq il-piż totali inizjali tal-ħut f'kull reċipjent tal-prova. Jekk il-ħut jerġgħu jintiżen fil-jum 14, ir-razzjon jerġa' jiġi kkalkolat. L-ikel għandu jinżamm mill-ħut 24 siegħa qabel l-użin.

▼B

L-ikel li ma jittiekilx u l-materjal tal-ħmieġ ta' l-imsaren għandu jitneħħa kuljum mir-reċipjenti tal-prova permezz ta' tindif bl-attenzjoni tal-qiegħ ta' kull tank bl-irdigħ.

1.8.2.4. *Dawl u temperatura*

Il-fotoperjodu u t-temperatura ta' l-ilma għandhom ikunu xierqa għall-ispeċi tal-prova (l-Appendiċi 1).

1.8.3. **Konċentrazzjonijiet tal-prova**

Normalment ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma meħtieġa, ikun xi jkun d-disinn tal-prova (ara t-taqsima 1.7.2). Tagħrif minn qabel tat- tossiċità tas-sustanza tal-prova (eż. minn prova akuta u/jew minn studji biex tinstab il-firxa) għandhom ikunu ta' għajnuna biex jintgħażlu l-konċentrazzjonijiet tal-prova xierqa. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk inqas minn ħames konċentrazzjonijiet huma użati. L-ogħla konċentrazzjoni ppruvata m'għandhiex teċċedi l-limitu tas-solubilità tas-sustanza fl-ilma.

Fejn jintuża aġent li jiffaċilità s-solubbilità biex igħin fil-preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-ħżin, il-konċentrazzjoni finali tiegħu m'għanduz ikun aktar minn 0,1 ml/l u għandu preferibbilment ikun l-istess fir-reċipjenti kollha tal-prova (ara t-taqsima 1.6.3). Madankollu, għandu jsir kull sforz biex jiġi evitat l-użu ta' materjali bħal dawn.

1.8.4. **Kontrolli**

In-numru ta' kontrolli bl-ilma tat-taħlit jiddependi fuq id-disinn tal-prova (ara t-taqsimiet 1.7-1.7.2). Jekk jintuża aġent li jiffaċilità s-solubbilità, allura l-istess numru ta' kontrolli bl-aġenti li jiffaċilitaw s-solubbilità daqs kontrolli bl-ilma tat-taħlit għandhom jiġu inklużi wkoll.

1.8.5. **Frekwenza ta' determinazzjonijiet analitiċi u tiqjis**

Matul il-prova, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma determinati f'intervalli regolari (ara hawn taħt).

Fil-provi flow-through, ir-rati ta' ċaqliq tas-soluzzjoni ta' ħżin dilwenti u tossikanti għandhom jiġu kkontrollati f'intervalli, preferibbilment kuljum, u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul il-prova. Fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma mistennija li jkunu bejn il-± 20 % tal-valuri nominali (i.e. fil-firxa ta' 80-120 %; ara t-taqsimiet 1.6.2 u 1.6.3), huwa rakkomandat li, bħala minimu, il-konċentrazzjonijiet l-aktar għoljin u dawk l-aktar baxxi jiġu analizzati fil-bidu tal-prova u f'intervalli ta' kull ġimgħa wara dan. Għall-prova fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova mhix mistennija li tibqa' bejn il-± 20 % tal-valuri nominali (fuq il-bażi ta' data dwar l-istabbiltà tas-sustanza tal-prova), huwa meħtieġ li jiġu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha, imma bl-użu ta' l-istess reġim.

Fil-provi semi-statiċi (ta' tiġdid) fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova hija mistennija li tibqa' bejn il-± 20 % tal-valuri nominali, huwa rakkomandat li, bħala minimu, il-konċentrazzjonijiet tal-prova l-aktar għoljin u dawk l-aktar baxxi jiġu analizzati meta ppreparati friski u immedjatament qabel it-tiġdid fil-bidu ta' l-istudju u ta' kull ġimgħa wara dan. Għall-provi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova mhix mistennija li tibqa' bejn il-± 20 % tal-valuri nominali, il-konċentrazzjonijiet kollha tal-prova iridu jiġu analizzati bl-użu ta' l-istess reġim bħal dak użat għal sustanzi aktar stabbli.

▼B

Huwa rakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet meqjusa. Madankollu, jekk ikun hemm evidenza disponibbli biex turi li l-konċentrazzjoni ta' soluzzjoni tas-sustanza tal-prova inżammet b'mod sodisfaċenti bejn il-± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-konċentrazzjoni inizjali meqjusa matul il-prova, allura r-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri nominali jew meqjusa.

Il-kampjuni jistgħu jeħtieġu li jiġu ffiltrati (eż. bl-użu ta' daqs tal-pori ta' 0,45 μm) jew soġġetti għal azzjoni ċentrifuga. Iċ-ċentrifugazzjoni hija l-proċedura rakkomandata. Madankollu, jekk il-materjal tal-prova ma jiġix assorbit mill-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll.

Matul il-prova, għandhom jitqiesu l-ossiġnu maħlul, il-pH u t-temperatura fir-reċipjenti tal-prova kollha. L-ebusija totali, l-alkalinità u s-salinità (jekk relevanti) għandhom jitqiesu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed ta' l-ogħla konċentrazzjoni. Bħala minimu, l-ossiġnu maħlul u s-salinità (jekk relevanti) għandhom jitqiesu tliet darbiet (fil-bidu, fin-nofs u fit-tmiem tal-prova). Fi provi semi-statiċi, huwa rakkomandat li l-ossiġnu maħlul jitqies aktar spiss, preferibbilment qabel u wara kull tiġdid ta' l-ilma jew mill-inqas darba fil-ġimgħa. Il-pH għandha titqies fil-bidu u fit-tmiem ta' kull tiġdid ta' l-ilma fi prova tat-tiġdid statiku u ta' l-inqas darba fil-ġimgħa fi provi flow-through. L-ebusija u l-alkalinità għandhom jitqiesu darba f'kull prova. It-temperatura preferibbilment għandha tkun ikkontrollata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wieħed tal-prova.

1.8.6. **Osservazzjonijiet**

Piż: Fit-tmiem tal-prova l-ħut kolha li jibqgħu ħajjin għandhom jintiżnu bħala piż imxarrab (ixxugat) jew fi gruppi skond ir-reċipjent tal-prova jew individwalment. L-użin ta' l-annimali bir-reċipjent tal-prova huwa preferibbli mill-użin individwali li jeħtieġ li l-ħut ikun immarkat individwalment. Fil-każ ta' tiqjis tal-piżijiet individwali għad-determinazzjoni tar-rata ta' żvilupp speċifika għall-ħuta individwali, il-metodu ta' teknika ta' l-immarkjar magħżula għandha tevita li toħloq tensjoni fl-annimali (alternattivi għall-immarkjar bl-iffriżar jistgħu jkunu xierqa, eż. l-użu ta' xlief fin ikkulurit).

Il-ħut għandu jkun eżaminat kuljum matul il-perjodu tal-prova u kull anormalità esterna (bħal emorraġija, telf tal-kulur) u mġieba anormali nnotata. Kull mewt għandu jiġi rreġistrat u l-ħut mejjet jitneħħa malajr kemm jista' jkun. Il-ħut mejjet ma jiġix sostitwit, ir-rata tat-tagħbija u d-densità tal-ħżin huma biżżejjed biex jiġu evitati effetti fuq l-iżvilupp minħabba bdil fin-numru ta' ħut f'kull tank. Madankollu, ir-rata ta' tmigħ tkun teħtieġ li tiġi aġġustata.

2. ***DATA* U RAPURTAĠĠ**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Huwa rakkomandat li espert ta' l-istatistika jkun involut kemm fid-disinn kif ukoll fl-analiżi tal-prova peress li dan il-metodu tal-prova jippermetti varjazzjoni konsiderevoli fid-disinn esperimentali bħal per eżempju, fin-numru ta' kompartamenti tal-prova, numru ta' konċentrazzjonijiet tal-prova, numru ta' ħut, eċċ. Minħabba l-għażliet li huma disponibbli fid-disinn tal-prova, gwida speċifika dwar il-proċedura ta' l-istatistika ma tingħatax hawn.

▼B

Ir-rati ta' żvilupp m'għandhomx jiġu kkalkolati għar-reċipjenti tal-prova fejn il-mortalità teċċedi l-10 %. Madankollu, ir-rata tal-mortalità għandha tkun indikata għall-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha.

Ikun liema metodu li jintuża biex tiġi analizzata d-data, il-kunċett ċentrali huwa r-rata ta' żvilupp speċifika r bejn il-ħin t_1 u l-ħin t_2. Din tista' tiġi definita f'ħafna modi skond jekk il-ħut hux immarkat individwalment jew le jew skond jekk hix meħtieġa l-medja għat-tank.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

fejn:

r_1 = rata ta' żvilupp speċifika għall-ħuta individwali

r_2 = rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank

r_3 = rata ta' żvilupp "psewdo" speċifika

w_1, w_2 = rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank $\log_e$

w_1 = logaritmu tal-piż ta' ħuta individwali fil-bidu tal-perjodu ta' studju

$\log_e w_2$ = l logaritmu tal-piż ta' ħuta individwali fit-tmiem tal-perjodu ta' studju

$\log_e W_1$ = medja tal-logaritmi tal-valuri w1 għall-ħut fit-tank fil-bidu tal-perjodu ta' studju

$\log_e W_2$ = medja tal-logaritmi tal-valuri w2 għall-ħut fit-tank fil-tmiem tal-perjodu ta' studju

t_1, t_2 = ħin (jiem) fil-bidu u fit-tmiem tal-perjodu ta' studju

r_1, r_2, r_3 jistgħu jiġu kkalkolati għall-perjodu ta' minn 0-28 jum u, fejn xieraq (i.e. meta t-tiqis fil-jum 14 ikun sar) għall-perjodi ta' minn 0-14 u minn 14-28 jum.

2.1.1. **Analiżi tar-riżultati bir-riġressjoni (mudellar tar-rispons għall-konċentrazzjoni)**

Dan il-metodu ta' analiżi jaqbel ma' relazzjoni tal-matematika adattata bejn ir-rata ta' żvilupp speċifika u l-konċentrazzjoni, u għalhekk jagħmel possibbli l-istima ta' l-"EC_x" i.e. kull valur ta' l-EC meħtieġ. Bl-użu ta' dan il-metodu l-kalkolu ta' r għall-ħut individwali (r_1) mhux meħtieġ u minflok, l-analiżi tista' tkun ibbażata fuq il-valur medju għat-tank ta' r (r_2). Dan il-metodu ta' l-aħħar huwa preferut. Huwa wkoll aktar xieraq fil-każ li jintuża l-iżgħar speċi.

Ir-rati ta' żvilupp medji speċifiċi għat-tank (r_2) għandhom jiġu mmarkati fuq graff kontra l-konċentrazzjoni, sabiex tiġi spezzjonata r-relazzjoni tar-rispons mal-konċentrazzjoni.

▼B

Sabiex tiġi mfissra r-relazzjoni bejn r_2 u l-konċentrazzjoni, għandu jintgħażel mudell xieraq u l-għażla tiegħu għandha tkun sostnuta b'raġunar xieraq.

Jekk in-numri ta' ħut li jibqgħu ħajjin f'kull tank ma jkunux l-istess, allura l-proċess ta' tqabbil tal-mudell, kemm jekk sempliċi jew jekk mhux lineari, għandu jiġi pożat biex jippermetti għal gruppi ta' daqsijiet differenti.

Il-metodu ta' tqabbil tal-mudell għandu jagħmel possibbli l-istima ta', per eżempju, l-EC_{20} u tad-dispersjoni tiegħu (jew l-iżball standard jew l-intervall ta' fiduċja). Il-graff tal-mudell imqabbel għandu jintwera fir-rigward tad-data sabiex s-suffiċjenza tat-tqabbil tal-mudell tista' tidher (8)(18)(19)(20).

2.1.2. **Analiżi tar-riżultati għall-istima tal-LOEC**

Jekk il-prova tkun inkludiet ir-replikazzjoni tat-tankijiet fil-livelli kollha tal-konċentrazzjoni, l-istima tal-LOEC tista' tkun ibbażata fuq analiżi tal-varjanza (ANOVA) tar-rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank (ara t-taqsima 2.1), segwita minn metodu adattat (eż. il-prova ta' Dunnett jew ta' Williams (12) (13) (14) (21)) għat-tqabbil tal-medja r għal kull konċentrazzjoni mal-medja r għall-kontrolli biex tiġi identifikata l-aktar konċentrazzjoni baxxa li għaliha din id-differenza hija sinifikattiva f'livell ta' probabbiltà ta' 0,05. Jekk is-supposizzjonijiet meħtieġa għall-metodi parametriċi ma jintlaħqux – distribuzzjoni mhux normali (eż. il-prova ta' Shapiro-Wilk) jew varjanza eteroġena (il-prova ta' Bartlett), għandha tingħata konsiderazzjoni għat-trasformazzjoni tad-data biex jiġu omoġenizzati l-varjanzi qabel ma ssir l-ANOVA, jew biex issir l-ANOVA miżuna.

Jekk il-prova ma tkunx inkludiet ir-replikazzjoni tat-tankijiet f'kull konċentrazzjoni, ANOVA bbażata fuq it-tankijiet ma tkunx sensittiva jew tkun impossibbli. F'din is-sitwazzjoni, kompromess aċċettabbli hu li l-ANOVA tkun ibbażata fuq ir-rata ta' żvilupp "psewdo" speċifika r_3 għall-ħut individwali.

Il-medja ta' l-r_3 għal kull konċentrazzjoni tal-prova tista' imbagħad tiġi mqabbla mal-medja ta' l-r_3 għall-kontrolli. Il-LOEC tista' imbagħad tiġi identifikata bħal qabel. Għandu jiġi konoxxut li dan il-metodu ma jipprovdi l-ebda konċessjoni għal, l-anqas protezzjoni kontra, il-varjabilità bejn it-tankijiet, aktar minn dik li hi ġġustifikata mill-varjabilità ta' bejn il-ħut individwali. Madankollu, l-esperjenza uriet (8) li l-varjabilità bejn it-tankijiet kienet żgħira ħafna meta mqabbla mal-arjabilità ġot-tank (i.e. bejn il-ħut). Jekk il-ħut individwali ma jkunx inkluż fl-analiżi, il-metodu ta' identifikazzjoni ta' *data* anomala (outlier) u l-ġustifikazzjoni għall-użu tagħha għandhom ikunu provduti.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Ir-riżultati għandhom ikunu interpretati bl-attenzjoni fejn il-konċentrazzjonijiet meqjusa ta' tossikant fis-soluzzjonijiet tal-prova jseħħu f'livelli qrib tal-limitu ta' osservazzjoni tal-metodu analitiku jew, fi provi semistatiċi, meta l- konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova tonqos minn soluzzjoni ppreparata friska għal qabel ma tiġġedded.

2.3. RAPPORT TAL-PROVA

Ir-rapport tal-prova għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼B

2.3.1. **Sustanza tal-prova:**

— natura fiżika u proprjetajiet fiżiċikimiċi relevanti,

— *data* dwar l-identifikazzjoni kimika inkluż il-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza tal-prova fejn xieraq.

2.3.2. **Speċi tal-prova:**

— possibbilment, l-isem xjentifku,

— razza, daqs, fornitur, kull trattament li jkun sar minn qabel, eċċ.

2.3.3. **Kondizzjonijiet tal-prova:**

— proċedura tal-prova użata (eż. semi-statiku/ta' tiġdid, flow-through, tagħbija, densità tal-ħżin, eċċ),

— disinn tal-prova (eż. numru ta' reċipjenti tal-prova, konċentrazzjonijiet u repliki tal-prova, numru ta' ħut f'kull reċipjent),

— metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħżin u frekwenza tat-tiġdid (l-aġent li jiffaċiltà s-solubbilità u l-konċentrazzjoni tiegħu għandhom jingħataw, meta użati),

— il-konċentrazzjonijiet nominali tal-prova, il-medji tal-valuri meqjusa u d-devjazzjonijiet mill-istandard tagħhom fir-reċipjenti tal-prova u l-metodu li bih dawn intlaħqu u evidenza li t-tiqjis jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova f'soluzzjoni vera,

— karatterisitiċi ta' l-ilma għat-taħlit: pH, ebusija, alkalinità, temperatura, konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul, livelli residwali ta' klorin (jekk meqjusa), karbonju organiku totali, solidi f'forma ta' suspensjoni, salinità tal-likwidu tal-prova (jekk meqjus) u kull tiqjis ieħor li jsir,

— kwalità ta' l-ilma fir-reċipjenti tal-prova: pH, ebusija, temperatura u konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul,

— informazzjoni dettaljata dwar it-tmigħ (eż. tip ta' ikel, għajn, ammont mogħti u frekwenza).

2.3.4. **Riżultati:**

— evidenza li l-kontrolli laħqu l-kriterju ta' validità għas-sopravivenza, u data dwar l-imwiet li jseħħu f'kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova,

— metodi ta' teknika ta l-istatistika analitika użati, statistika bbażata fuq ir-repliki jew il-ħut, trattament tad-data u ġustifikazzjoni tal-metodi ta' teknika użati,

— data mqassma f'forma tabulari dwar il-piż ta' ħut individwali u l-piċ medju fil-jiem 0, 14 (jekk meqjusa) u 28, valuri tar-rati ta' żvilupp medji speċifiċi għat-tank jew psewdo speċifiċi (kif xieraq) għall-perjodi 0-28 jum jew possibbilment 0-14 u 14-28,

— riżultati ta' l-analiżi ta' l-istatistika (i.e. analiżi tar-rigressjoni jew ANOVA) preferibbilment f'forma tabulari u grafika u l-LOEC (p = 0,05) u n- NOEC jew l-ECx ma', meta possibbli, l-iżbalji standard, kif xieraq,

▼B

— inċidenza ta' kull reazzjoni mhux tas-soltu mill-ħut u kull effett viżibbli ikkaġunat mis-sustanza tal-prova.

3. REFERENZI

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Ir-Rapport tal-WRc Nru PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M. J and Grandy N. J. (1990). EEC: Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Ir-Rapport Finali Lill-Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej. Ir-Rapport tal-WRc Nru KEE: 2600-M.

(3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pġ. 1855-1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pġ. 157-164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes). Arch. Econ. Conta. Toxicol. 28, pġ. 287-297.

(7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (Oryzias latipes). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner u D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pġ. 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, jew atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Ir-Rapport EPS 1/RM/28, 81 pp. Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(10) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 ta' Diċembru 1991.

(11) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pġ. 1096-1121.

(12) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pġ. 482-491.

(13) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pġ. 103-117.

▼B

(14) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, pġ. 123-133.

(15) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, pġ. 33-41.

(16) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Il-Kapitolu IX fit-Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(17) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pġ. 1485-1494.

(18) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Ir-Rapport EA-6189 (American Petroleum Institute

(19) Publication, Nru 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Ir-Rapport Tekniku Nru 05-88 tan-National Effluent Toxicity Assessment Center. Settembru 1988. 12-il pp.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pġ. 510-531.

▼B

ANNESS 1

SPEĊI TA' ĦUT RAKKOMANDAT GĦALL-PROVA U KONDIZZJONIJIET TAL-PROVA ADATTATI

Speċi	Firxa rakkomandata tat-temperatura tal-prova (°C)	Fotoperjodu (sigħat)	Firxa rakkomandata għall-piż inizjali tal-ħut (g)	Preċiżjoni meħtieġa fit-tiqjis	Rata tat-tagħbija (g/l)	Densità tal-ħżin (kull litru)	Ikel	Tul tal-prova (jiem)
Speċi rakkomandati								
Oncorhynchu s mykiss L-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout)	12,5 - 16,0	12 – 16	1 – 5	Sa l-eqreb 100 mg	1,2 - 2,0	4	Ikel proprjetarju niexef magħmul minn ħut żgħir tas-salmonid	≥ 28
Speċi oħra li huma ddokumentati tajjeb:								
Danio rerio zebrafish	21 – 25	12 – 16	0,050 - 0,100	Sa l-eqreb 1 mg	0,2 - 1,0	5 – 10	Ikel ħaj (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes ricefish (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 - 0,100	Sa l-eqreb 1 mg	0,2 - 1,0	5 – 20	Ikel ħaj (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

▼B

ANNESS 2

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA GĦAT-TAĦLIT AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja f'partikoli	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhix jonizzata	< 1 µg/l
Klorin residwali	< 10 µg/l
Pestiċidi ta' l-organofosforu totali	< 50 ng/l
Pestiċidi ta' l-organoklorin totali biż-żjieda ta' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l

▼B

ANNESS 3

Serje logaritmika ta' konċentrazzjonijiet tajbin għat-test ta' tossiċità (9)

Kolonna (numru ta' konċentrazzjonijiet bejn 100 u 10, jew bejn 10 u 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Serje ta' ħames (jew iktar) konċentrazzjonijiet suċċessivi jistgħu jingħażlu minn kolonna. Il-*mid-points* ta' bejn il-konċentrazzjonijiet f'kolonna (x) jinsabu f'kolonna (2x + 1). Il-valuri msemmija jistgħu jirrappreżentaw konċentrazzjonijiet li jingħadu bħala perċentwal f'volum jew piż (mg/l jew µg/l). Il-valuri jistgħu jkunu multiplikati jew diviżi bi kwalunkwe *power of* 10 kif inhu xieraq. Il-kolonna 1 tista' tintuża jekk ikkun hemm inċertezza konsiderevoli fil-livell ta' tossiċità.

▼B

C.15. **PROVA TA' TOSSIĊITÀ B'TERMINU QASIR FUQ *EMBRIJONI* U STADJI TA' SAC-FRY TAL-ĦUT**

1. **METODU**

Dan il-metodu ta' ittestjar għal tossiċità b'terminu qasir huwa replika tal-OECD TG 212 (1998).

1.1. DAĦLA

Dan it-test ta' tossiċità b'terminu qasir fuq embrijoni u stadji ta' sac-fry tal-ħut huwa prova b'terminu qasir fejn jiġu esposti l-istadji tal-ħajja minn meta bajda ġdida tiġi fertilizzata sa l-istadju ta' sac-fry. Ebda ikel ma huwa provdut fit-test ta' l-embrijon u sac-fry, u t-test għandu jiġi terminat waqt li s-sac-fry għadhom jiġu nutriti mill-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajda.

L-għan ta' dan it-test huwa sabiex jiddefinixxi effetti letali, u sa ċertu punt effeti sub-letali ta' kimiċi fuq l-istadji speċifiki u fuq l-ispeċi ittestjati. Dan it-test jipprovdi informazzjoni utli b'tali mod li jista' (a) jifforma pont bejn testijiet letali u dawk sub-letali (b) jintuża bħala test ta' screening għal test komplut fuq l-istadji kollha tal-bidu tal-ħajja jew għal test ta' tossiċità kronika u (c) jista' jintuża biex jiġu ittestjati speċi li it-tkabbir tagħhom m'huwiex avvanzat biex ikopri biżżejjed il-perjodu ta' transizzjoni minn nutriment endoġenu għal dak esoġenu.

Ta' min jiftakar li testijiet li jinkorporaw il-fażijiet kollha tal-ħajja tal-ħuta huma ġeneralment suġġetti li jagħtu stima eżatta tat-tossiċità kronika tal-kimiċi għall-ħut, u kwalunkwe tnaqqis fl-espożizzjoni fir-rigward ta' stadji tal-ħajja jistgħu inaqqsu is-sensittività ta' dan it-test u għalhekk jissottovalutaw it-tossiċità kronika. Għalhekk hu mistenni li t-test ta' l-embrijun u ta' l-istadji ta' sac-fry ikun inqas sensittiv minn dak ta' test komplut fuq l-istadji kollha tal-bidu tal-ħajja, partikolarment fejn jidħlu kimiċi li għandhom lipofilità għolja (log P_{ow} > 4) u kimiċi b'mod ta' azzjoni tossika speċifika. Madankollu differenzi żgħar bejn iż-żewġ testijiet huma mistennija għal kimiċi li m'għandhomx mod ta' azzjoni narkotika speċifika (1).

Qabel ma' ġie ppublikat, dan it-test ta' l-embrijun u ta' sac-fry ġie ppruvat l-aktar fuq ħut ta' l-ilma ħelu *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – magħruf aktar bħala zebrafish). Għaldaqstant l-appendiċi 1 jagħti gwida aktar dettaljata ta' l-eżekuzzjoni ta' dan it-test fuq din l-ispeċi. Dan ma jeskludix l-użu ta' speċi oħra għal liema diġà hemm xi prova disponibbli (Tabella 1).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Konċentrazzjoni minima b'effett sinjifikanti (LOEC): hija l-aktar konċentrazzjoni baxxa ttestjata mis-sustanza tat-test fejn is-sustanza ikollha effett sinifikattiv (f'p < 0,05) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, kull konċentrazzjoni 'l fuq mill-LOEC għandu jkollha effett ta' ħsara daqs jew aktar minn dawk osservati fl-LOEC.

Konċentrazzjoni massima mingħajr effetti sinifikanti (NOEC): hija l-prova ta' konċentrazzjoni eżatt taħt l-LOEC.

▼B

1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST

L-istadji ta' l-embrijon u tas-sac-fry tal-ħut huma esposti għal sensiela ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza għall-prova dissolta fl-ilma. Il-protokoll jippermetti għażla bejn proċedura semi-statika jew proċedura b'ċirkolazzjoni kontinwa. Din l-għażla tiddependi fuq in-natura tas-sustanza li ser tiġi ittestjata. Dan it-test jibda billi jitpoġġew bajd fertilizzat fil-kontenituri u jintemm eżatt qabel ma l-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd ta' xi waħda mil-larva f'xi kontenitur tkun assorbita kompletament jew qabel ma l-kontrolli jibdew imutu tal-ġuħ. Effetti letali u sub-letali huma evalwati u mqabbla mal-valuri relattivi għall-kontrolli bl-iskop li tiġi determinata l-konċentrazzjoni minima b'effetti sinifikanti. L-alternattiva hi li jiġu analizzati billi jintuza mudell rigressiv sabiex tkun stmata il-konċentrazzjoni li tista' tikkawża effett perċentwali (i.e. LC/ECx, fejn x hija effett % definit).

1.4. INFORMAZZJONI FUQ IS-SUSTANZA TAT-TEST

Ir-riżultati ta' test ta' tossiċità qawwija (ara metodu C.1) preferibilment ma' l-ispeċi magħżula għal dan it-test, għanhom ikunu disponibbli. Ir-riżultati jistgħu jkunu utli biex tintgħażel sensiela ta' konċentrazzjonijiet tat-test mill-istadji tal-bidu tal-ħajja. Is-solubilità ta' l-ilma (inkluż is-solubilità fl-ilma tat-test) u l-pressa tal-fwar għandhom ikunu magħrufa. Għandu jkun hemm metodu ta' min jorbot fuqu disponibbli, għal kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test, b'eżattezza magħrufa u rappurtata kif ukoll il-limitu ta' rivelazzjoni.

L-informazzjoni utli fuq is-sustanza tat-test sabiex jiġu definiti il-kondizzjonijiet għall-eżekuzzjoni tat-test tinkludi il-formola strutturali, il-purità tas-sustanza, dawl stabbli, stabilità fil-kondizzjonijiet ta' l-eżekuzzjoni tat-test, pKa, Pow u r-riżultati ta' test ta' bijodegradibiltà immedjata (ara metodu C.4).

1.5. VALIDITÀ TAT-TEST

Biex test ikun validu dawn il-kondizzjonijiet li ġejjin għandhom japplikaw:

— is-sopravivenza komplessiva tal-bajd fertilizzat fil-kontrolli, u fejn hu relevanti, fil-kontenituri ta' solvent biss, għandha tkun aktar jew daqs il-limiti definiti fl-Annessi 2 u 3,

— matul it-test, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġnu dissolt għandha tkun bejn 60 u 100 % tal-valur ta' l-arja saturata (ASV),

— it-temperatura ta' l-ilma m'għandhiex tvarja b'iktar minn ± 1,5 °C bejn il-kompartamenti divesri jew bejn ġranet suċċessivi waqt il-ħin tat-test u għandha tkun fil-limitu tas-sensiliet speċifikati ta' temperaturi għall-ispeċi użati fit-test (Annessi 2 u 3).

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Il-Kompartamenti tat-test**

Jista' jintuża kull tip ta' reċipjent tal-ħġieġ jew kimikament inerti. Id-dimensjonijiet tar-reċipjenti għandhom ikunu kbar biżżejjed sabiex ikunu konformi mar-rata ta' tagħbija (ara taqsima 1.7.1.2). Hu rakkomandat li l-kompartamenti tat-test ikunu pożizzjonati kif ġie ġie fil-post fejn ser isir it-test. Jekk fil-laboratorju jeżistu effetti sistematiċi kontrollabbli permezz ta' separazzjoni bi blokki, preferibilment għandu jintuża disinn sperimentali bi blokki ta' daqs irregolari fejn kull trattament ikun preżenti f'kull blokka, monflok ma jintuża disinn kompletament irregolari. Jekk jintuża il-metodu ta' għeluq, dan għandu jittieħed in konsiderazzjoni fl-analiżi sussegwenti ta' *data*. Il-kompartamenti tat-test għandhom ikunu imħarsa minn kwalunkwe interferenza.

1.6.2. **Selezzjoni ta' speċi ta' ħut**

Speċi ta' ħut rakkomandat huma mniżżla f'tabella 1A. Din ma tippermettix l-użu ta' speċi oħrajn (eżempji huma mogħtija f'tabella 1B), iżda il-proċedura tat-test tista tkun adattata sabiex tipprovdi kondizzjonijiet adattati għat-test. F'dan il-każ, ir-raġuni li tiġġustifika l-għażla ta' l-ispeċi u l-metodu esperimentali għandhom ikunu magħrufa.

1.6.3. **Trobbija tal-ħut riptoduttiv**

Dettalji fuq iż-żamma tal-ħut riproduttiv f'kondizjonijiet sodisfaċenti jinstabu f'OECD TG 210 ([1]) u f'referenzi (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4. **Immaniġġjar ta' embrijoni u larva**

Embrijoni u larva jistgħu ikunu esposti, fil-kontenitur ewlieni, f'kontenituri iżgħar bil-ġnub jew bit-truf miksija b'xibka sabiex jippermettu ċ-ċirkolazzjoni tas-sustanza tat-test madwar il-kontenitur. Wieħed jista jasal għal ċirkolazzjoni non turbolenti f'dawn il-kontenituri iżgħar billi jdendilhom ma' brazz b'tali mod li jkunu jistgħu jiċċaqalqu 'l fuq u 'l isfel iżda xorta waħda l-organi jibqgħu mgħarrqa; tista' tiġi użata wkoll sistema bis-sufun. Bajd iffertilizzat ta' ħut salmonidu jista' jiġi sistemati fuq xkafef jew xbieki b'fetħiet kbar biżżejjed li jippermettu il-bajd jgħaddu wara it-tfaqqis. Il-pipetti tat-tip pasteur huma l-aktar adattati għat-tneħħija ta' l-embrijoni u tal-larva fit-testijiet semistatiċi b'tiġdid kuljum ta' l-ilma (ara paragrafu 1.6.6).

Il-kontenituri, il-gradilji jew ix-xbieki li ntużaw biex iżommu l-bajd ġol-kontenitur ewlieni tat-test, għandhom jitneħħew wara li jfaqqsu l-larva ([1]), bl-eċċezzjoni li x-xbieki għandhom jitħallew sabiex iwaqqfu l-ħut milli jaħarbu. Jekk ikun hemmm il-bżonn li jiġu mċaqalqa il-larva, dawn m'għandhomx ikunu esposti għall-arja u m'għandhomx jintużaw xbiek biex jiġu mħarrba ħut mill-kontenituri tal-bajd (prekawzjoni bhal din tista ma tkunx neċessarja għal speċ inqas delikat bħal per eżempju il-carp). Il-ħin tat-trasferiment ivarja skond l-ispeċi u mhux dejjem ikun hemm bżonn ta' dan it-trasferiment. Għat-teknika semistatika jistgħu jintużaw buqari jew kontenituri baxxi, u jekk ikun hemm bżonn dawn ikunu armati b'xibka bħala paraventu kemm kemm 'il fuq mill-qigħ tal-buqar. Jekk il-volum ta' dawn il-kontenituri huwa biżżejjed sabiex jaqbel mal-bżonn tat-tagħbija, (ara 1.7.1.2) ma jkunx hemm bżonn ta' trasferiment ta' embrijoni u larva.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, “Fish, Early-life Stage Toxicity Test”.

▼B

1.6.5. **Ilma**

Kull ilma li jkun konformi mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma dilwit kif imniżżel f'Appendiċi 4 u ġo liema ilma l-ispeċi użata fit-test turi kapaċità ta' sopravivenza almenu daqs dik deskritta f'Appendiċi 2 u 3, huwa ilma tajjeb biex ikun użat fittest. L-ilma għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-tets. Il-pH għandha tjinżamm fil-limitu ta' ± 0,5 unità pH. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma dilwit ma jħallix effetti mhux mixtieqa fuq ir-riżultat tat-test (per eżempju taħwid tas-sustanza), jew kuntrarjament jaffettwa il-ħut riproduttiv, għandhom jittieħdu kampjuni biex jiġu analizzati regolarment. Qisien ta' metalli tqal (per eżempju. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd u Ni), anjoni u katjoni maġġuri (eż. Ca, Mg, Na, K, Cl u SO_4), pestiċidji (per eżempju pestiċidji b'organofosforu totali u organoklorin totali), karbon totalment organiku u solidi sopiżi għandhom ikunu magħmula kull tliet xhur, meta ilma tat-taħlit ikollu kwalità relattivament kostanti. Jekk il-kwalità ta' l-ilma tkun kostanti almenu għal sena, qatgħat deċiżivi jistgħu jkunu anqas frekwenti u l-intervalli jistgħu jkunu anqas frekwenti (per eżempju kull sitt xhur).

1.6.6. **Soluzzjonijiet tat-test**

Soluzzjonijet tat-test fuq il-konċentrazzjonijiet magħżula, huma preparati b'taħlit ta' soluzzjoni ewlenija.

Din is-soluzzjoni għall-ħażna għandha tkun preparata preferibilment billi is-sustanza tat-test titħallat u titħawwad ma' l-ilma b'mezzi mekkaniċi (per eżempju tqanqil u ultrasonikazzjoni). Sabiex tiġi milħuqa soluzzjoni konċentrata ewlenija, jistgħu jintużaw kolonni saturati (kolonni solubili). Sa fejn hu possibbli għandu jiġi evitat l-użu ta' solvents jew dipersants (aġenti solubilizzanti); madankollu, ċertu komposizzjonijiet jistgħu jiġu bżonnjuż f'ċerti każi sabiex tiġi prodotta soluzzjoni konċentrata xierqa. Eżempji ta' solvents adattati huma aċetun, ethanol, metanol, dimethylformamide u triethyleneglycol. Eżempji ta' dispersants adattati huma Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % and HCO-40. Meta jintużaw aġenti li jkollhom bijo-degradibbiltà mgħaġġla (per eżempju: aċetun) jew li jevaporaw malajr, wieħed irid juża kawtela peress li dawn jistgħu jikkawżaw problemi fil-kreazzjoni ta' batterja f'testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa. Meta jkun użat aġent solubbli, dan m'għandux iħalli l-ebda effett sinifikanti fuq is-sopravivenza u l-anqas xi effett negattiv fuq l-istadji inizjali ta' ħajja kif juri il-kontroll li jkun solvent biss. Madankollu, għandu jsir kull sforz biex jiġi evitat l-użu ta' materjal bħal dan.

Għat-teknika semi-statika jistgħu jintużaw żewġ proċeduri ta' tiġdid differenti; jew (i) li jiġu preparati soluzzjonijiet ġodda f'kontenituri nodfa u il-bajd ħaj u il-larva jiġu trasferiti delikatament fil-kontenituri ġodda li jkollhom fihom volum żgħir mis-soluzzjoni il-qadima, kif ukoll jiġi evitat li jiġu esposti għall-arja, jew (ii) l-oganiżmi tat-test jinżammu fil-kontenituri filwaqt li proporzjon (almenu tliet kwarti) mill-ilma tat-test jinbidel. Il-frekwenza ta' tiġdid ta' dan il-mezz ikun jiddependi fuq l-istabilità tas-sustanza ittestejata, iżda tiġdid kuljum ta' l-ilma huwa rakkomandat. Jekk minn testijiet preliminari ta' stabilità (ara sezzjoni 1.4) jirriżulta li l-konċentrazzjoni tas-sustanza ittestjata m'hijiex stabbli (jiġifieri barra mill-parametri 80-120 %, tal-konċentrazzjoni nominali jew inqas minn 80 % ta' tal-konċentrazzjoni imkejla inizjalment) waqt il-perjodu ta' tiġdid, jeħtieġ li jittieħed in-konsiderazzjoni l-użu ta' test b'ċirkolazzjoni kontinwa. Fi kwalunkwé każ jeħtieġ li jiġi evitat kull li jiġu stressjati il-larvae waqt li l-ilma jkun qed jiġġedded.

▼B

Testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa jirrikjedu sistema li kontinwament tiddispensa u tħallat is-soluzzjoni inizjali (per eżempju metering pump, proportional diluter, saturator system) biex ikunu jistgħu jipprovdi serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartamenti tat-test. T Ir-rati ta' ċirkolazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u ta'l-ilma għat-taħlit m'għandhomx ivarjaw b'iktar minn 10 % matul it-test. Rata ta' ċirkolazzjoni ekwivalenti almenu għall-volum ta' ħames kompartamenti tat-test għal 24 siegħa hija adattata (2).

1.7. PROĊEDURA

Fil-letteratura wieħed isib infornazzjoni utli fuq il-prestazzjoni ta' testijiet fuq l-embrijuni tal-ħut kif ukoll fuq it-testijiet ta' tossiċità ta' sac-fry, b'xi eżempji jinstabu wkoll fil-biblijografija inkluża ma' dan it-test (7) (8) (9).

1.7.1. **Kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.7.1.1. *Tul ta' Żmien*

Dan it-test għandu jibda preferibilment fi żmien 30 minuta wara li jkunu ġew iffertilizzati l-bajd. L-embrijoni għandhom jiġu mgħarrqa fis-soluzjoni tal-prova qabel jew eżatt wara li jkun beda l-istadju tal-qsim tal-blastodisc, imma dejjem qabel ma jkun beda l-istadju tal-gastrula. It-test ma jistax jinbeda immedjatament wara l-fertlizzazzjoni jekk il-bajd ikun ġej mingħand sorsi kummerċjali. Billi kull dewmien jista jinfluwenza serjament is-sensittività tat-test, it-test għandu jibda fi żmien tmien sigħat wara il-fertilizzazzjoni. Billi il-larva ma jingħatawx ikel waqt il-perjodu ta' espożizzjoni, it-test għandu jintemm eżatt qabel ma tkun inxtorbot il-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd fi kwalunkwe mill-kompartamenti li qed isiru t-testijiet fihom jew qabel ma jkunu jew imutu minħabba nuqqas ta' ikel. Id-dewmien jiddependi fuq l-ispeċi li qed tkun użata. F'l-Appendiċi 2 u 3 wieħed isib xi rakkomandazzjonijiet f'dan ir-rigward.

1.7.1.2. *Tagħbija*

In-numru ta' bajd fertilizzat għandu jkun biżżejjed sabiex jissodisfaw it-talbiet ta' l-istatistika. Dawn għandhom ikunu distribwiti kif ġie ġie fost it-trattamenti, u għal kull konċentrazzjoni għandhom jintużaw almenu 30 bajda fertilizzata imqassmin indaqs, (jew almenu ndaqs kemm jista' jkun billi jista' jkun diffiċli li jkollok gruppi ndaqs meta tkun qed tuża ċertu speċi) bejn almenu tliet kompartamenti replika. Ir-rata ta' tagħbija (bijomassa skond il-volum tas-soluzzjoni ittestjata) għandha tkun baxxa biżżejjed b'tali mod li tippermetti li tinżamm konċentrazzjoni ta' ossiġnu dissolt ta' almenu 60 % ASV mingħajr arjazzjoni. Huwa rakkomandat li għal testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa, ir-rata ta' tagħbija ma taqbiżx 0,5 g/l għal 24 siegħa u ma taqbiżx 5 g/l ta' soluzzjoni fi kwalunkwé ħin (2).

1.7.1.3. *Dawl u temperatura*

It-temperatura tal-fotoperjodu u ta' l-ilma għandha tkun waħda xierqa għall-ispeċi li qed ikunu ttestjati (Appendiċi 2 u 3). Biex tkun ikkontrollata it-temperatura ikun opportun li jintuża reċipjent tat-test miżjud.

▼B

1.7.2. **Konċentrazzjonijiet tat-test**

Normalment huma rikjesti ħames konċentrazzjonijiet tat-test li għandhom fattur ta' differenza kostanti u li ma jaqbiżx it-3,2. Fl-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet tat-test wieħed għandu jieħu in-konsiderazzjoni il-kurva li tirrelata l-LC50 mal-perjodu ta' espożizzjoni fl-istudju ta' tossiċità qawwija. F'xi ċirkostanzi, bħal per eżempju f'testijiet tal-limitu, ikun aktar adattat li jintużaw inqas minn ħames konċentrazzjonijiet kif ukoll l-intervall ta' konċentrazzjonijiet ikun aktar ristrett. Trid tingħata spjegazzjoni jekk jintużaw anqas minn ħames konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet b'sustanza għola minn LC_{50} f'69 siegħa jew 100mg/1, bl-ebda differneza għal liema hija l-aktar baxxa, m'għandhomx għalfejn jiġu ttestjati. Is-sustanzi m'għandhomx ikunu ittestjati fl-ilma tat-test 'il fuq mil-limitu ta' solubilità tagħhom.

Meta aġent solubilizzanti ikun użat biex jgħin fil-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet għat-test (ara sezzjoni 1.6.6), il-koċentrazzjoni finali fir-reċipjenti tat-test m'għandhomx ikunu aktar minn 0,1 ml/l u għandu jkun l-istess fir-reċipjenti kollha.

1.7.3. **Kontrolli**

Aparti il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ittestjata, irid jiġi ippreparat ukoll kontroll bl-ilma għat-taħlit (ripetuta skond il-bżonn) u eventwalment kontroll ukoll bl-ilma li fih l-aġent solubilizzanti (ripetut skond il-bżonn).

1.7.4. **Frekwenza tad-determinazzjonijiet u qisien analitiċi**

Waqt it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza huma determinati f'intervalli regolari.

Huwa rakkomandat li f'testijiet semi-statiċi, il-konċentrazzjoni tat-test, li mistennija tibqa' fl-iskala ta' ± 20 % tal-valur nominali, (i.e. bejn 80-120 %; ara sezzjoni 1.4 u 1.6.6), l-għola u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test, ikunu analizzati meta jkunu għadhom kif ġew preparati u immedjatament qabel it-tibdil ta' l-ilma almenu tliet darbiet imqassmin tul il-perjodu tat-test (i.e. l-analiżi għandhom jiġu effettwati fuq kampjun ta' l-istess soluzzjoni li tkun għadha kemm ġiet ippreparata u wara fil-mument li ser tkun ħa tinbidel).

Huwa neċessarju li fil-każi ta' testijiet fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza li qed tiġi ittestjata m'hix mistennija li tibqa fil-limitu ta' ± 20 % tal-valur nominali (fuq il-bażi ta' data fuq l-iatbilità tas-sustanza) jiġu analizzati il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test, eżatt meta jkunu għadhom kif ġew preparati u kif ikunu qed jinbidlu, iżda tinżamm l-istess skema (i.e. fi tliet okkażjonijiet imqassma mat-test kollu). Id-determinazzjoni tas-sustanza ittestjata qabel it-tiġdid tas-soluzzjoni, għandha ssir fuq replika tar-reċipjent għal kull konċentrazzjoni tat-test. L-intervalli ta' bejn id-determinazzjonijiet ma jridux ikunu aktar minn sebat ijiem. Huwa rakkomandat li ir-riżultati ikunu ibbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk ikun hemm evidenza li turi li l-konċentrazzjoni tas-sustanza ittestjata fis-soluzzjoni hi fil-limitu ta' ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-konċentrazzjoni mkejla inizjalment matul it-test, allura ir-riżultati jistgħu ikunu bażati fuq valuri nominali jew fuq valuri imkejla inizjalment.

Għal testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa, l-użu ta' reġim ta' kampjuni simili għal dak deskritt għal testijiet semistatiċi hu adattat (iżda f'dan il-każ, il-qisien ta' soluzzjonijiet antiki ma japplikawx). Madankollu, jekk it-test idum aktar minn sebat ijiem, huwa rakkomandat li jiżdiedu l-okkażjonijiet meta jittieħdu kampjuni (eż. tliet settijiet ta' qisien) biex tkun żgurata l-istabilità tal-konċentrazzjonijiet ittestjati.

▼B

Jista' jagħti l-każ li il-kampjuni jkollhom bżonn li jiġu separati jew iffiltrati (Eż. billi jintużaw pori ta' daqs 0,45 im). Madankollu, billi la s-separazzjoni u l-anqas il-filtrazzjoni ma jidher li dejjem jisseparaw il-frazzjoni non bijodisponibbli tat-test minn dik bijodisponibbli, il-kampjuni jistgħu ma jiġux suġġetti għal dawk it-trattamenti.

Waqt it-test, l-ossiġnu dissolt, il-pH u it-temperatura, għandhom jiġu mkejla f'kull reċipjent tat-test. L-ebusija kif ukoll is-salinità (jekk relevanti) totali, għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed li jkollu l-ogħla konċentrazzjoni. L-ossiġnu u is-salinità (jekk relevanti), għandhom jitkejlu minimament tliet darbiet (fil-bidu, fin-nofs u fl-aħħar tat-test). Huwa rakkomandat, li f'testijiet semi-statiċi, l-ossiġnu dissolt jiġi mkejjel aktar spiss, preferibiliment qabel u wara kull tiġdid ta' l-ilma, jew almenu darba fil-ġimgħa. Il-pH, f'testijiet semi-statiċi, għandha tiġi mkejla fil-bidu u fl-aħħar ta' kull tiġdid ta' l-ilma u ta' l-inqas darba fil-ġimgħa fil-każ ta' testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa. L-ebusija għandha tkun imkejla darba f'kull test. It-temperatura għandha titkejjel kuljum u preferibilment għandha tkun osservata kontinwament almenu f'kompartament wieħed tat-test.

1.7.5. **Osservazzjonijiet**

1.7.5.1. *Stadju ta' żvilupp embrijoniku*

L-istadju embrijoniku (i.e. embriju fl-ewwel stadju ta' żvilupp) fil-bidu ta' l-espożizzjoni tas-sustanza ittestjata, għandu jkun verifikat kemm jista' jkun bi preċiżjoni. Dan jista' jsir billi jintuża kampjun rappreżentattiv tal-bajd li jkun preżervat u separat kif jixraq. Għal deskrizzjoni u xbiehat ta' l-istadji embrijoniċi wieħed jista' jirreferi għall-letteratura (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Tfaqqis u sopravvivenza.*

Ta' l-inqas darba kuljum, għandhom isiru oservazzjonijiet, kif ukoll jiġu dokumentati ċ-ċifri tat-tfaqqis u tas-sopravivenza. Jista' jagħti l-każ li jkunu jridu jsiru osservazzjonijiet aktar frekwenti fil-bidu tat-test (eż. kull 30 minuta matul l-ewwel tliet sigħat) billi f'ċerti każi dawn jista' jkollom aktar relevanza milli n-numru ta' mwiet biss (eż. meta hemm effetti tossiċi qawwijin). Embirijoni u larva mejta għandhom jitneħħew hekk kif jiġu innutati billi dawn jitħassru malajr. Wieħed għandu joqgħod ferm attent meta jkunu qed jitneħħew individwi mejta li ma jitlaqqgħux jew issir xi ħsara lill-bajd/larva ta' ħdejhom billi dawn huma delikati ħafna. Ir-raġunijiet tal-mewt ivarjaw skond f'liema stadju ta' ħajja jkunu:

— għal bajd: partikolarment fl-istadji tal-bidu, nuqqas notevoli ta' traslużidità u bidla fil-kulur, kawża ta' koagulazzjoni li twassal għal dehra bajda mċajpra,

— għal embrijoni: nuqqas ta' ċaqliq tal-ġisem u/jew nuqqas ta' taħbit tal-qalb u/jew tidnis imċajpar tal-kulur fi speċi li l-embrijoni tagħhom huma normalment trasparenti,

— għal larva: immobilità u/jew nuqqas ta' movement respiratorju u/jew nuqqas ta' taħbit tal-qalb u/jew is-sistema ta' nervituri ċentrali ssir ta' kulur abjad imċajpar u/jew nuqqas ta' reazzjoni fl-istimolu mekkaniku.

▼B

1.7.5.3. *Aspett anormali*

In-numru ta' larva li juru anormalitajiet fil-forom tal-ġisem u/jew pigmentazzjoni, u l-istadju ta' assorbiment tal-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar ta' bajda, għandhom ikunu dokumentati f'inetrvalli adekwati skond it-tul tat-test kif ukoll in-natura ta' l-anormalità deskritta. Ta' min jinnota li embrijoni u larva anormali huma fenomenu naturali u fil-kontroll(i) ta' xi speċi jsitgħu jlaħħqu ħafna punti perċentwali. Annimali anormali għandhom jitneħħew mir-reċipjenti tat-test, meta jmutu biss.

1.7.5.4. *Imġieba anormali*

Anormalitajiet, bħal per eżempju teħid tan-nifs mgħaġġel ħafna, għawm mhux koordinat, u inattività atipiku għandhom jiġu dokumentati f'intervalli adekwati skond it-tul tat-test. Dwan l-effetti, għalkemm diffiċli biex jiġu kwanitifikati, meta jkun osservati, jistgħu jgħinu fl-interpretazzjoni ta' l-informazzjoni fuq l-imwiet, jiġifieri, jipprovdu informazzjoni fuq il-mod ta' azzjoni tossika tas-sustanza.

1.7.5.5. *Tul*

Fi tmiem it-test, huwa rakkomandat li jitkejlu it-tulijiet ta' kull individwu u jistgħu jintużaw qisien standard, mifrudin jew tat-tul totali. Madankollu, jekk il-ġewnaħ tad-denb titħassar jew titħaffer, għandhom jintużaw qisien standard. Ġeneralment, f'testijiet immexxija tajjeb, il-koeffiċjent tal-varjazzjoni fit-tul fost ir-repliki fil-kontrolli għandu jkun ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Piż*

Fl-aħħar tat-test, jistgħu jitkejlu il-piżijiet individwali; il-piżijiet xotti (24 siegħa f60 °C) huma preferuti minn dawk umduži (wara li jkunu ġew ixxuttati). Ġeneralment, ftestijiet immexxija tajjeb, il-ko-effiċjent tal-varjazzjoni fil-piż fost ir-repliki fil-kontrolli għandu jkun ≤ 20 %.

Dawn l-osservazzjonijiet iwasslu sabiex l-informazzjoni mogħtija hawn tkun għad-dispożizzjoni ta' statistika analitika:

— mwiet kumulattiv,

— numru ta' larva b'saħħita fl-aħħar tat-test,

— ħin biex jibda u jispiċċa it-tfaqqis (i.e. 90 % ta' tfaqqis fir-repliki),

— numru ta' larva li jfaqqsu kuljum,

— tul (u qies) ta' annimali li baqgħu ħajjin fi tmiem it-test,

— numru ta' larva li huma deformati jew b'apparenza anormali,

— numru ta' larva li qed juru imġieba anormali.

▼B

2. *DATA* U RAPPURTAĠĠ

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Huwa rakkomandat li l-istatistiku jkun involut kemm fid-disinn kif ukoll fl-analiżi tat-test billi il-metodu jħalli lok għal varjazzjoni konsiderevoli fl-esperiment fid-disinn, per eżempju fin-numru ta' kompartamenti tat-test, fin-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' bajd fertilizzat li ser jibda bih u fil-parametri mkejla. Fid-dawl ta' dawn l-alternativi fid-disinn tat-test, gwisda speċifika fuq il-proċeduri statistiċ i m'humiex mogħtija hawn.

Jekk ser jiġu kalkolati l-LOEC/NOEC allura jkun hemm bżonn li l-varjazzjonijiet jiġu analizzati f'kull sett ta' repliki billi tintuża l-analiżi tal-varjazzjoni (ANOVA) jew proċeduri ta' tabelli kontinġenti. Il-metodu ta' Dunnett jista' jkun utli (12) (13) sabiex isir tqabbil bejn ir-riżultati f'konċentrazzjonijiet individwali u r-riżultati fil-kontrolli. Huma wkoll disponibbli eżempji oħra utli (14) (15). Id-daqs ta' l-effett li jiġi identifikat meta jintuża l-metodu u proċeduri oħra, (i.e. il-qawwa tat-test) għandu jkun kalkolat u dokumentat. Għandu jkun innutat li mhux kull osservazzjoni mniżżla f'taqsima 1.7.5.6 hija adattata għal analiżi ta' statsitika bil-metodu ANOVA. Per eżempju, mwiet kumulattiv u n-numru ta' larva b'saħħitha fit-tmiem tat-test, jistgħu jiġu analizzati b'metodi ta' probit.

Jekk se jkunu kalkolati LC/EC_xs, iridu jkunu mdaħħla fid-*data* kurva(i) adattata(i) bħall-kurva loġistika, billi jintuża metodu statistiku bħal kaxxi minimi jew kaxxi minimi li mhux linejari. Il-kurva(i) għandha(hom) tkun(u) mqieghda f'parametri sabiex l-LC/EC_x interessata u l-iżball standard tagħha jista' jkun kalkolat direttament. Dan iħaffef ħafn aktar il-kalkoli tal-limiti ta' kunfidenza madwar l-LC/EC_x. Sakemm ma jkunx hemm motivi sabiex jiġu preferiti livelli affidabbli differenti, għandha tiġi kwotata 95 % ta' kunfidenza b'żewġ livelli. Preferibilmet, il-proċedura ta' adattament għandha tipprovdi mezz biex jiġi valutat is-sinifikat tan-nuqqas ta' addattament. Jistgħu jintużaw metodi grafiċi għal kurvi xierqa. Analiżi rigressiva hi adattata għall-osservazzjonijiet kollha mniżżla f'taqsima 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Ir-riżultati għandhom ikunu trattati b'kawtela fil-każijiet ta' meta fis-soluzzjonijiet tat-test jitkejlu konċentrazzjonijiet ta' sustanzi tossiċi fil-limitu ta' osservazzjoni tal-metodu analitiku. L-interpretazzjoni tar-riżultati ta' koċentrazzjonijiet 'il fuq mil-livell ta' solubilità tas-sustanza, għandha ssir b'kawtela wkoll.

2.3. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi din l-informazzjoni:

2.3.1. **Sustanza tat-test:**

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżiċi relevant ital-kimika,

— fejn relevanti, l-identifikazzjoni kimika tad-*data*, inklużi l-purità u l- metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza ttestjata.

▼B

2.3.2. **Speċi ittestjati:**

— l-isem xjentifiku, il-purità, in-numru ta' ħut riproduttiv (jiġifieri kemm intużaw speċi femminili biex ġew prodotti in-numru ta' bajd fertilizzat li ġie użat fit-test), minn fejn oriġinaw u l-metodu ta' kollezzjoni tal-bajd fertilizzat u manipulazzjoni suċċessiva.

2.3.3. **Kondizzjonijiet tat-test:**

— proċedura użata fit-test (eż. semistatika jew b'ċirkolazzjoni kontinwa, perjodu ta' ħin mill-fertilizzazzjoni sal-bidu tat-test, manipulazzjoni, eċċ),

— fotoperjodu(i),

— disinn tat-test (eż. numru ta' kompartamenti tat-test u repliki tagħhom, numru ta' embrijoni replikati),

— metodu ta' preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ta' ħażna u l-frekwenza ta' tiġdid (l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjonijiet tiegħu għandhom jingħataw meta jiġu użati),

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-valuri mkejla kif ukoll il-medja u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu ta' kif dawn jintlaħqu u jekk is-sustanza ttestjata tinħallx fl-ilma b'konċentrazzjonijiet inqas minn dawk ittsetjati, għandhom jiġu provduti sabiex il-qisien jirreferu għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ttestjata fis-soluzzjoni,

— karatteristiċi ta' l-ilma mħallat: p pH, soliditá, temperatura, konċentrazzjoni ta' ossiġnu dissolt, livelli ta' klorin residwu (jekk ġie mkejjel) karbon organiku totali, suspended solids, salinità tal-mezz ittestjat (jekk ġie mkejjel) u kwalunkwe qies ieħor,

— kwalità ta' l-ilma fil-reċipjenti tat-test: pH, soliditá, temperatura u konċentrazzjoni ta' ossiġnu maħlul.

2.3.4. **Riżultati:**

— riżultati minn studji preliminary fuq l-istabilità tas-sustanza ittestjata,

— xiehda li l-kontrolli jikkorrispondu ma' l-istandard ta' sopravivenza aċċettabbli ta' l-ispeċi ittestjati (Appendiċi 2 u 3),

— data fuq mortalità/sopravivenza fl-istadju ta' embrijun u larva kif ukoll mortalità u sopravivenza komplessiva,

— ġranet biex ifaqqsu u kwantità

— ġranet biex ifaqqsu u kemm faqqsu – data għal tul (u piż),

— incidenza u deskrizzjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi, jekk jeżistu,

— incidenza u deskrizzjoni ta' effetti ta' mġieba, jekk jeżistu,

— analiżi statistika u trattament tad-data,

— għal testijiet li użaw l-ANOVA, l-inqas konċentrazzjoni b'effetti sinjifikanti (LOEC) F'P=0,05 f' konċentrazzjoni massima mingħajr effetti sinjifikattivi (NOEC) għal kull risposta analizzata, inkluż deskrizzjoni tal-proċeduri statistiċi utilizzati u indikazzjoni ta' l-entità ta' l-effett li seta' ġie individwat,

▼B

— għal testijiet li użaw it-teknika rigressiva, l-LC/ECx u intervalli ta' kunfidenza u deskrizzjoni grafika tal-mudell użat għall-kalkolazzjoni tiegħu,

— spjegazzjoni għal kull devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ittestjar.

3. **REFERENZI**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Comunities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). it-temperatura Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (Brachydanio rerio) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist.. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Test Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon jew Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, Brachydanio rerio. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology – an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, Oryzias latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (Oryzias latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Tabella 1A

Speċi ta' ħut rakkomandat għat-test

Ilma Ħelu
Oncorhynchus mykiss Rainbow trout (9)(16)
Danio rerio Zebrafish (7)(17)(18)
Cyprinus caprio Karpjun komuni (8)(19)
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka (20)(21)
Pimephales promelas Fathead minnow (8)(22)

▼B

Tabella 1B

Eżempji ta' speċi oħra dokumentati tajjeb li ġew użati

Ilma Ħelu	Ilma Mielaħ
Carassius auratus Goldfish (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23)(24)(25)
Lepomis macrochirus Bluegill (8)	*Clupea harengus* Herring (24)(25)
	Gadus morhua Merluzz (24)(25)
	Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (23)(24)(25)

▼B

ANNESS 1

GWIDA FUQ IL-PRESTAZZJONI TA' TEST TA' TOSSIĊITÀ FUQ EMBRIJONI U SAC-FRY TA' ZEBRAFISH (*BRACHYDANIO RERIO*)

DAĦLA

Iż-zebrafish toriġina mill-kosta ta' Coromandel fl-Indja fejn tgħix fi xmajjar b'kurrent mgħaġġel ta' ilma. Hija ħuta komuni ta' l-akwarju li tappartjeni għall-familja tal-carp, u informazzjoni dwar il-proċeduri għal ħarsien u l-kultura tagħha tista' tinstab f'kotba standard dwar ħut tropikali. Il-bijoloġija u l-użu tagħha għal riċerka ta' sajd kienu riveduti minn Laale (1).

Il-ħuta rari tkun itwal minn 45 mm. Il-ġisem hu ta' forma ċilindrika b' 7-9 strixxi orizzontali ta' lewn blu skur arġentat. Dawn l-istrixxi jkopru l-ġwienaħ tal-ġenb u ta' wara. Id-dahar huwa ta' lewn aħdar kulur iż-żebbuġa. L-irġiel huma rqaq min-nisa. In-nisa ileqqu aktar u żaqqhom hi aktar mitluqa partikolarment qabel ma jbidu.

Il-ħut adult hu kapaċi jittollera varjazzjonijiet kbar fit-temperatura, pH u ebusija. Madankollu, għandhom ikunu provduti kondizzjonijiet ottimali biex ikun hemm ħut f'saħħtu li jipproduċi bajd ta' kwalità.

Waqt li l-mara tkun qed tbid, ir-raġel jiġri warajha u jtiha bir-ras, u l-bajd ikun fertilizzat hekk kif ikun ħiereġ. Il-bajd, li hu trasparenti u ma jwaħħalx, jaqgħu fil-qigħ fejn jistgħu jiġu mittiekla mill-ġenituri stess. Il-proċess ta' meta l-ħuta tbejjed jiġi influwenzat mid-dawl. Jekk id-dawl ta' filgħodu jkun adattat, il-ħut ġeneralment ibejjed fis-sigħat bikrin ta' wara s-sebħ.

Ta' kull ġimgħa, mara tista' tipproduċi lottijiet ta' diversi mijiet ta' bajd.

KONDIZZJONIJIET TA' ĦUT RIPRODUTTIV, RIPRODUZZJONI U STADJI TAL-BIDU TAL-ĦAJJA

Agħżel numru adegwat ta' ħut f'saħħtu u żommhom f'ilma adattat (eż. Appendiċi 4) almenu għal ġimgħatejn qabel it-tqegħid ta' bajd proġettat. Il-grupp ta' ħut għandu jitħalla jirriproduċi ta' l-anqas darba qabel ma jipproduċu il-lott ta' bajd użat fit-test. Id-densità ta' ħut f'dan il-perjodu ma jridx ikun aktar minn gramma ta' ħut għal kull litru. Tibdil regolari ta' l-ilma jew l-użu ta' sistemi ta' purifikazzjoni jippermettu li din id-densità tkun ogħla. It-temperatura fit-tankijiet li qed jinżammu fihom għandha tinżamm sa 25 ± 2 ºC. Il-ħut għandu jkollu dieta varjata, li tista' tikkonsisti minn per eżempju ikel kummerċjali niexef, Arthemia mfaqqsa friska, chironomids, Daphnia, dud abjad (Enchytraeids).

Żewġ proċeduri li fil-prattika wasslu għal-lott suffiċjenti ta' bajd f'saħħtu u fertiliizzat sabiex ikun kondott test huma spjegati hawn taħt:

Tmien nisa u 16-il raġel huma mitfugħa f'tank l-i fih 50 litru ta' ilma għat-taħlit, protett minn dawl direct u mitluqa kemm jista jkun mingħajr ma jiġu disturbati għal almenu 48 siegħa. Tilar biex fih isir it-tqegħid ta' bajd huwa mqiegħed fil-qigħ ta' l-akwarju wara nofsinhar fil-ġurnata ta' qabel jibda t-test. Dan it-tilar jikkonsisti fi gwarniċ (ħġieġ plexi jekk materjal adattat ieħor), għoli 5-7 ċm u b'xibka ħarxa ta' 2-5 mm mwaħħla ma' fuq u xibka fina ta' 10-30 μm mal-qiegħ. Max-xibka l-ħarxa nsibu diversi "siġar tat-tqegħid ta' bajd", magħmulin minn ħabel tan-najlon maħlul. Wara li l-ħut ikunu tħallew fid-dlam għal 12-il siegħa, jinxtegħel dawl baxx biex jingħata bidu għat-tqegħid ta' bajd. 2-4 sigħat wara it-tqegħid ta' bajd, it-tilar li fih ibidu jitneħħa u jinġabru l-bajd. Dan it-tilar iċaħħad il-ħut milli jieklu l-bajd u jiffaċilita wkoll il-ġbir tal-bajd. Il-grupp ta' ħut għandhom ikunu biedu ta' l-inqas darba qabel it-tqegħid ta' bajd li jintuża fit-test.

▼B

5-10 ħutiet maskili u femminili huma mqiegħda individwalment ta' l-inqas ġimgħatejn qabel it-tqegħid ta' bajd. Wara 5-10 ijiem, iż-żaqq tan-nisa tkun tidher mitluqa u il-papillae ġenitali tagħhom ikunu viżibbli. Ħut maskili m'għandhomx papillae. It-tqegħid ta' bajd isir f'tankijiet apposta armati b'xibka falza fil-qiegħ (kif deskritt hawn fuq). It-tank hu mimli b'ilma għat-taħlit, sabiex il-fond ta' l-ilma 'il fuq mix-xibka jkun ta' 5-10 ċm. Mara waħda u żewġt irġiel huma mqiegħda fit-tank ġurnata qabel it-tqegħid pjanat. It-temperatura ta' l-ilma tiżdied gradwalment bi grad wieħed għola mit-temperatura akklimatizzanti. Id-dawl jintefa u possibilment it-tank jitħalla mingħajr ma jkun disturbat kemm jista' jkun. Filgħodu jinxtegħel dawl baxx sabiex jinbed it-tqegħid ta' bajd. Sa 2-4 sigħat wara il-ħut jitneħħa u l-bajd jinġabar. Jekk ikun hemm bżonn ta' lottijiet ikbar ta' bajd minn dak l-ammont li tista' tipproduċi mara waħda, allura jistgħu jiġu preparati numru suffiċjenti ta' tankijiet għat-tqegħid ta' bajd fl-istess ħin. Meta is-suċċess tar-riproduzzjoni ta' nisa individwali qabel it-test (daqs tal-lott u l-kwalità)jiġi dokumentat, dawk in-nisa bl-għola rata ta' suċċess riproduttiv, jistgħu ikunu magħżula għar-riproduzzjoni.

Il-bajd għandhom ikunu trasferiti għal ġor-reċipjenti tat-test permezz ta' tubi tal-ħġieġ (id-dijametru minn ġewwa m'għandux ikun inqas minn 4mm) fornuti bi flexible suction bulb. L-ammont ta' ilma li fih jitpoġġew il-bajd biex jiġu trasferiti għandu jkun minimu kemm jista' jkun. Il-bajd huma itqal mill-ilma u jistgħu joħorġu minn ġot-tubi. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat li l-bajd (u l-larva) jiġu f'kuntatt ma' l-arja. Għandu jsir eżami mikroskopiku tal-kampjun(i) tal-lott(ijiet) sabiex jiġi żgurat li m'hemm l-ebda irregolarità fl-ewwel stadji ta' l-iżvilupp. Diżinfezzjoni tal-bajd mhux permess.

Ir-rata ta' mwiet fost il-bajd tkun l-ogħla fl-ewwel 24 siegħa wara l-fertilizzazzjoni. Mortalità ta' 5-40 % hi normali f'dan il-perjodu. Il-bajd jiddeġenera bħala riżultat ta' falliment fil-fertilizzazzjoni jew fl-iżvilupp. Il-kwalità tal-lott jiddependi fuq il-ħut nisa billi certu nisa jipproduċu bajd ta' kwalità tajba filwaqt li oħrajn qatt ma jipproduċu bajd ta' kwalità. Anke ir-rata ta' żvilupp u r-rata ta' tfaqqis tvarja minn lott għall-ieħor. Il-bajd fertilizzat b'suċċess u l-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd jgħixu sew, normalment 'il fuq minn 90 %. F'25 °C il-bajd ifaqqas 3-5 ijiem wara l-fertilizzazzjoni u l-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd tkun assorbita bejn wieħed u ieħor 13-il ġurnata wara l-fertilizzazzjoni.

L-iżvilupp embrijoniku kien definit tajjeb minn Hisaoka u Battle (2). Minħabba it-trasparenza tal-bajd u tal-larva wara it-tfaqqis, jista' jiġri li l-iżvilupp tal-ħut ikun segwit minn preżenza ta' malformazzjonijiet. Bejn wieħed u ieħor erba' sigħat wara it-tqegħid ta' bajd, il-bajd mhux fertilizzat ikun jingħaraf minn dak fertilizzat (3). Għal dan l-eżami, il-bajd u l-larva jitpoġġew f'kompartamenti b'volum baxx u studjati taħt mikroskopju.

Il-kondizzjonijiet tat-test, li japplikaw għall-istadji ta' bidu tal-ħajja huma mniżżla f'Appendiċi 2. Valuri ottimali tal-pH u ta' l-ebusija ta' l-ilma tat-taħlit huma 7,8 u 250 mg $CaCO_3$/l rispettivament.

KALKOLAZZJONIJIET U STATISTIKA

Hu propost metodu b'żewġ stadji. L-ewwel, id-data fuq il-mortalità, żvilupp anormali u l-ħin tat-tfaqqis huma analizzati statistikament. Wara, it-tul tal-ġisem ta' dawk il-konċentrazzjonijiet f'liema ma kien hemm l-ebda effett kuntrarju fuq l-ebda minn dawn il-parametri, hu evalwat statistikament. Dan l-approċċ huwa rakkomandat billi it-tossikant jista' joqtol ħut iżgħar, itawwal il-ħin għat-tfaqqis u jwassal għal malformazzjonijiet kbar u sussegwentement jinfluwenza il-kejl ta' tul. F Barra minn dan, ser ikun hemm bejn wieħed u ieħor l-istess ammont ta' ħut biex ikunu mkejla għal kull trattament, sabiex tiġi assigurata il-validità ta' l-istatistika tat-test.

▼B

DETERMINAZZJONIJIET TA' L-LC_{50} U EC_{50}

Il-persentaġġ ta' bajd u larva sopraviventi huwa kalkolat u tiġi koreġuta abbażi tal-mortalità fil-kontrolli skond il-formola ta' Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

billi,

P = % ta' sopravivenza korretta

P' = % ta' sopravivenza osservata fil-konċentrazzjoni tat-test

C = % sopravivenza fil-kontroll

Jekk hu possibbli, l-LC_{50} tiġi determinata b'metodu adattat fi tmiem it-test.

Jekk hi mixtieqa l-inklużjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi fl-istatistika ta' l-EC_{5O}, wieħed jista' jsib gwida għal dan fi Stephan (5).

STIMA TA' LOEC U NOEC

L-għan tat-test fuq il-bajd u s-sac-fry huwa li jqabbel konċentrazzjonijiet diversi miz-zero mal-kontroll, u allura jiġi determinat l-LOEC. Għalhekk għandhom jiġu utilizzati diversi proċeduri ta' tqabbil (6) (7) (8) (9) (10).

REFERENZI

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statis. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

▼B

ANNESS 2

KONDIZZJONIJIET TAT-TEST, DEWMIEN U KRITERJI TA' SOPRAVIVENZA GĦAL SPEĊI RAKKOMANDATI

Speċi	Temp (°C)	Salinità (0/00)	Fotoper jod (sigħat) (hrs)	Dewmien fl-istadji (ġranet)		Dewmien tipiku tat-test	Sopravivenza tal-Kontroll (% minimu)	
				embrijo	Sac-fry		Suċċess fit-tfaqqis	Perjodu ta' wara t-tfaqqis
ILMA ĦELU								
Brachydanio rerio Zebrafish	25 ± 1	—	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Appena wara l-fertilizzazzjoni (fil-bidu ta' l-istadju tal-gastrula) sa ħamest ijiem wara it-tfaqqis (8-10 ijiem)	80	90
Oncorhynchus mykiss Rainbow trout	10 ± 1 (1) 12 ±1 (2)	—	0 (a)	30 – 35	25 – 30	Appena possibbli wara il-fertilizzazzjoni (fil-bidu ta' l-istadju tal-gastrula) sa 20 ġurnata wara t-tfaqqis (50-55 ġurnata)	66	70
Cyprinus carpio Karpjun komuni	21 – 25	—	12 – 16	5	> 4	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (8-9 ġranet)	80	75
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 5 ijiem wara it-tfaqqis (13-16-il ġurnata)	80	80
Pimephales promelas Fathead minnow	25 ± 2	—	16	4 – 5	5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (8-9 ġranet)	60	70

(1) Għall-embrijoni.
(2) Għall-*larvae*.
(a) Dlam għall-embrijoni u għal-*larvae* sa ġimgħa wara t-tfaqqis ħlief meta jkunu spezzjonati. Imbagħad dawl baxxa matul it-test.

▼B

ANNESS 3

Kondizzjonijiet tat-test, dewmien u kriterji għal sopravivenza ta' speċi oħra dokumentati tajjeb

Speċi	TEMP (^{0}C)	Salinità (0/00)	Fotoperjod (siegħat) (hrs)	Dewmien fl-istadji (ġranet)		Dewmien tipiku tat-test	Sopravivenza tal-Kontroll (% minimu)	
				embrijo	SAC-FRY TEST		Suċċess tat-tfaqqis	Wara t-tfaqqis
ILMA ĦELU								
Carassius auratus Goldfish	24 ± 1	—	—	3 – 4	> 4	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (7 ġranet)	—	80
Leopomis macrochirus Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	| Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (7 ġranet)	—	75
ILMA MIELAĦ								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22 -25	15 – 22	12	1,5	10	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 5 ijiem wara it-tfaqqis (6-7 ġranet)	80	60
Clupea harengus Herring	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 3 ijiem wara it-tfaqqis (23-27 ġranet)	60	80
Gadus morhua Cod	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 3 ijiem wara it-tfaqqis (18-il ġurnata)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15 – 30	12	—	—	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4/7 ijiem wara it-tfaqqis (28 ġurnata)	> 75	80

▼B

ANNESS 4

XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA GĦAT-TAĦLIT AĊĊETTABBLI

Sustanza	Konċentrazzjoni
Materja ta' partiċelli	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhix ionizzata	< 1 µg/l
Klorina residwali	< 10 µg/l
Pestiċidi organophosphorus totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organophosphorus totali u polychlorinated biphenyls	< 50 ng/l
Klorina organika totali	< 25 ng/l

▼B

C.16. NAĦAL – PROVA TA' TOSSIĊITÀ ORALI AKUTA

1. METODU

Dan il-metodu ta' prova ta' tossiċità akuta huwa replika ta' l-OECD TG 213 (1998).

1.1. DAĦLA

Din il-prova ta' tossiċità hija metodu li tintuża fil-laboratorju, magħmul biex issir stima tat-tossiċità orali akuta tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti u kimiċi oħra, lin-naħal adult li jkun qiegħed jaħdem.

Fl-istima u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' tas-sustanzi, d-determinazzjoni ta' tossiċità akuta orali fin-naħal tista' tukun meħtieġa, e.ż. meta jkun probabbli li n-naħal ġie espost għal xi kimika. Din il-prova ta' tossiċità orali akuta ssir sabiex tiġi determinata it-tossiċità intrinsika ta' pestiċidi u kimiċi oħra għan-naħal. Ir-riżultati ta' din il-prova għandhom jintużaw biex jiġi definit il-bżonn għal evalwazzjoni ulterjuri. B'mod partikolari, dan il-metodu jista' jintuża f'programmi mqassma f'aktar minn fażi waħda sabiex jiġu determinati il-ħsarat tal-pestiċidi għan-naħal, ibbażat fuq sekwenza ta' provi ta' tossiċità ġol-laboratorju għal-esperimenti fuq is-semi-kamp u fuq il-kamp (1). Il-pestiċidi jistgħu jiġu ittestjati bħala sustanzi attivi (s.a.) jew bħala prodotti fformulati.

L-istandard tossiku għandu jiġi stabbilit sabiex tiġi vverifikata s-sensittività tan-naħal u l-preċiżjoni tal-prova proċedurali.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċità orali akuta: hija l-effett avvers li jseħħ f'perjodu massimu ta' 96 siegħa (s) ta' amministrazzjoni orali ta' dosa singola ta' sustanza sperimentali.

Doża: hija l-ammont tas-sustanza ikkonsmata. Id-doża hija espressa bħala l-massa (μg) tas-sustanza sperimentali għal kull annimal sperimentali (μg/bee). L-ammont reali għal kull naħla ma jistax jiġi kkalkolat peress li n-naħal jintema' kollettivament, imma tista' ssir stima tad-doża medja (it-total tas-sustanza sperimentali kkonsmata/in-numru ta' naħal sperimentali f'kull gaġġa).

LD_{50} (doza letali medja) orali: hija doża singola ta' sustanza miġjuba statistikament li tista' tikkawża l-mewt f'50 % ta' l-annimali meta tiġi somministrata oralment. Il-valur ta' l-LD_{50} huwa espress bħala μg tas-sustanza sperimentali kull naħla. Fil-każ tal-pestiċidi, is-sustanza sperimentali tista' tkun kemm sustanza attiva (s.a.) kif ukoll prodott formulat li jkunu fih wieħed jew aktar sustanzi attivi.

Mortalità: annimal huwa registrat mejjet meta ikun kompletament immobbli.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-PROVA

Naħal ħaddiema adulti (*Apis mellifera*) huma esposti għal firxa ta' dożijiet tas-sustanza sperimentali imferrxa f'soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal imbagħad jintema' bl-istess dieta, libera mis-sustanza sperimentali. Matul mill-anqas 48 s il-mortalità tiġi reġistrata kull jum u pparagunata mal-valur tal-kontroll. Jekk ir-rata tal-mortalità tkun qed tiżdied bejn 24 s u 48 s filwaqt illi l-mortalità tal-kontrolli tibqa' f'livell aċċettabbli, i.e. < = 10 %, ikun xieraq illi l-prova tiġi estiża għal massimu ta' 96 s. Ir-riżultati jiġu analizzati sabiex jiġi kkalkulat l-LD_{50} fl-24 s u t-48 s u, fil-każ li l-istudju jiġi pprolongat, fit-72 s u fis-96 s.

▼B

1.4. VALIDITÀ TAL-PROVA

Sabiex prova tkun valida, japplikaw l-kondizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità medja għan-numru totali ta' kontrolli m'għandiex teċċedi 10 % fl-aħħar tal-prova,

— l-LD_{50} ta' l-istandard tossiku jilħaq il-firxa speċifikata.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-PROVA

1.5.1. **Kollezzjoni ta' naħal**

Jintużaw naħal ħaddiema żagħżagħ adulti ta' l-istess razza, i.e. naħal ta' l-istess età, mitmugħa bl-istess mod, eċċ. In-naħal għandu jinkiseb minn kolonji li għandhom reġina, li huma mitmugħin tajjeb, u sakemm dan ikun possibbli, li jkunu eżenti minn mard, bi storja u stat fiżjoloġiku magħruf. Jistgħu jiġu miġbura filgħodu l-jum tal-prova jew filgħaxija ta' qabel il-prova u miżmuma fil-kondizzjonijiet tal-prova sal-ġurnata ta' wara. Jistgħu jintużaw ukoll naħal miġbura minn għamliet bla duqqajs. Għandu jiġi evitat l-ġbir fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-ħarifa peress illi matul dan iż-żmien n-naħal ibiddel l-istat fiżjoloġiku tiegħu. Jekk il-provi ikollom jsiru fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-ħarifa, in-naħal jistgħu jitqegħdu f'inkubatur u mrobbija għal gimgħa b'"ħobż tan-naħal" (pollinu miġbur mix-xehdiet) u soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal li jiġi trattat b'sustanzi kimiċi, bħal m'huma antibiotiċi, prodotti antivarroa, eċċ., m'għandux jintuża għal provi ta' tossiċità qabel erba' ġimgħat mit-tmiem ta' l-aħħar trattament.

1.5.2. **Kondizzjonijiet ta' manteniment u alimentazzjoni**

Jintużaw gaġġeġ li jitnaddfu faċilment u li għandhom ventilazzjoni tajjba. Kull materjal xieraq jista' jintuża, e.ż. azzar stainless, xbieki tal-ħadid, plastik jew gaġġeġ ta' l-injam disposable, eċċ. In-numru idejali huwa ta' gruppi ta' għaxar naħliet f'kull gaġġa. Il-qies tal-gaġġeġ sperimentali għandu jkun xieraq għan numru ta' naħal, i.e. jipprovdi spazju adegwat.

In-naħal għandu jinżamm fid-dlam ġewwa kamra sperimentali f'temperatura ta' 25 ± 2 °C. L-umdità relattiva, normalment madwar 50-70 %, għandha tiġi reġistrata matul il-prova kollha. Proċeduri ta' manipolazzjoni, inklużi t-trattamenti u l-osservazzjonijiet jistgħu jsiru fid-dawl (naturali). L-alimentazzjoni tikkonsisti f'soluzzjoni ta' sukrosju fl-ilma b'konċentrazzjoni finali ta' 500 g/l (50 % w/v). Wara li jingħataw id-dożii sperimentali, l-alimentazzjoni għandha tingħata *ad libitum*. Is-sistema ta' alimentazzjoni għandha tħalli ssir reġistrazzjoni ta' kemm jiġi kkonsmat ikel f'kull gaġġa (ara taqsima 1.6.3.1). Tista' tintuża pipetta tal-ħġieġ (madwar 50 mm twila u 10 mm wiesgħa bin-naħa l-miftuħa li tidjieq għal djametru ta' madwar 2 mm).

1.5.3. **Preparazzjoni tan-naħal**

In-naħal miġbur jiġi allokat saltwarjament f'gaġġeġ sperimentali, li mbagħad jitpoġġew saltwarjament fil-kamra sperimentali.

▼B

Qabel ma tibda l-prova in-naħal jista' jitħalla bla ikel għal ħin massimu ta' 2 s. Huwa rakkomandat li n-naħal jitħalla bla ikel qabel it-trattament sabiex fil-bidu tal-prova in-naħal kollu jirriżulta ugwali f'termini tal-kontenut intestinali. Qabel ma tinbeda l-prova jeħtieġ illi jitneħħa n-naħal li jkun qiegħed imut u li jiġi sostitwit b'naħal b'saħħtu.

1.5.4. **Preparazzjoni tad-doża**

Meta s-sustanza sperimentali tkun waħda li tista' titħallat ma' ilma, din tista' titħallat direttament f'50 % soluzzjoni tas-sukrosju. Għal prodotti u sustanzi oħra tekniċi li ma jinħallux daqshekk malajr fl-ilma, jistgħu jintużaw vetturi oħra bħal solventi organiċi, emulsifiers jew dispersants li għandhom livell ta' tossiċità baxxa għan-naħal (e.ż. acetone, dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Il-konċentrazzjoni tal-vettura tiddependi fuq is- solubiltà tas-sustanza sperimentali li għandha tkun l-istess għal konċentrazzjonijiet kollha li ssirilhom il-prova. Madankollu, konċentrazzjoni tal-vettura ta' madwar 1 % hija ġeneralment xierqa u m'għandhiex tkun għola.

Sustanzi xierqa għall-kontroll għandhom jitlestew, i.e. meta solvent jew dispersant jintuza biex iħoll is-sustanza sperimentali, għandhom jintużaw żewġ gruppi ta': soluzzjoni fl-ilma, u soluzzjoni ta' sukrosju li jkollha s-solvent/trasportatur bil-konċentrazzjoni użata fis-soluzzjonijiet dożi.

1.6. PROĊEDURA

1.6.1. **Gruppi sperimentali u gruppi għall-kontroll**

In-numru ta' dożi u ta' repliċi ttestjati għandhom ikunu konformi mar-rekwiżiti statistiċi għad-determinazzjoni ta' l-LD_{50} mal-limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Normalment, għal-prova jeħtieġu ħames dożi f'serie ġeometrika, b'fatturi li ma jaqbżux 2.2, u li jkopru l-firxa għall-LD_{50}. Madankollu, għandhom jiġu determinati l-fattur tat-taħlit ma' l-ilma u n-numru ta' konżentrazzjonijiet għad-doża b'relazzjoni ma' kemm tkun immejla l-kurva tat-tossiċità (doża kontra mortalità) u għandu jiġi ikkunsidrat il-metodu statistiku li ġie magħżul għall-analiżi tar-riżultati. Prova ta' riċerka fuq il-firxa tippermetti li jintgħażlu l-konċentrazzjonijiet appropjati għad-dożi.

Minimu ta' tlett gruppi ta' provi repetuti, kull wieħed ta' tliet naħliet, għandu jiġi dożat b'kull konċentrazzjoni sperimentali. Oltre s-serje sperimentali hu neċessarju li jiġu analizzati minimu ta' tliet lottijiet ta' kontroll, kull waħda ta' 10 naħliet. Huma meħtieġa tliet gruppi ta' kontroll anke għal solventi/trasportaturi użati (ara taqsima 1.5.4).

1.6.2. **Sustanza tossika standard**

Fis-serje sperimentali għandha tiġi inkluża sustanza tossika standard. Jeħtieġ li jintgħażlu mill-anqas tlett dożi li jkopru l-valur mistenni ta' LD_{50}. Għal kull doża sperimentali jintużaw mill-inqas tlett gaġġeġ repliċi, kull waħdha fiha għaxar naħliet. Is-sustanza tossika standard preferuta hija d-dimethoate, fejn l-LD_{50}-24 s orali rrapurtat huwa fil-firxa ta' 0,10- 0,35 μg s.a./naħla (2). Madankollu, huma ukoll aċċettabbli sustanżi tossiċi standard oħra jekk data suffiċenti tkun tista' tinġieb sabiex tiġi vverifikata r-risposta mistennija rigward id-dożi(e.ż. parathion).

▼B

1.6.3. **Espożizzjoni**

1.6.3.1. *Somministrazzjoni tad-doża*

Kull grupp sperimentali ta' naħal għandu jirċievi 100-200 µl soluzzjoni tas-sukrosju ġo l-ilma ta' 50 %, li jkunu jinsabu fiha s-sustanza in eżami bil-konċentrazzjoni xierqa. Għal dawk il-prodotti li jdumu ma jinħallu fl-ilma, li għandhom livell ta' tossiċità baxx jew li għandhom livell ta' konċentrazzjoni baxx fil-formulazzjoni, huwa meħtieġ volum akbar peress illi jkunu jridu jintużaw proporzjonijiet għola fis-soluzzjoni tas-sukrosju. Il-monitoraġġ tal-kwantità ta' ikel trattat li jiġi ikkonsmat minn kull grupp hu neċessarju. Ġaladarba jittiekel (normalment f'3-4 s), il-kontenitur ta' l-ikel għandu jitneħħa minn ġol-gaġġa u mibdul b'kontenitur li jkun fih biss is-soluzzjoni tas-sukrosju. Is-soluzzjonijiet tas-sukrosju huma mbagħad provduti *ad libitum*. Għal xi sustanzi li jkollhom konċentrazzjoni elevata hu possibbli li n-naħal jirrifjuta l-ikel trattat. Wara ħin massimu ta' 6 s, l-ikel trattat li ma jiġix ikkonsmat għandu jinbidel b'soluzzjoni ta' sukrosju biss. Stima ta' l-ikel trattat ikkonsmat hija neċessarja (e.ż. kejl tal-volum/piż ta' l-ikel trattat li jkun fadal).

1.6.3.2. *Tul ta' żmien*

Preferibbilment, il-prova għandha ddum 48 s mill-mument meta s-soluzzjoni sperimentali tiġi sostitwita b'soluzzjoni ta' sukrosju biss. Jekk il-mortalità tkompli tgħola għal aktar minn 10 % wara l-ewwel 24 s, d-durata tal-prova għandha tiġi estiża għal massimu ta' 96 s sakemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

1.6.4. **Osservazzjonijiet**

L-mortalità tiġi reġistrata 4 s wara li tibda l-test u sussegwentement wara 24 s u wara 48 s (i.e. wara li tingħata d-doża). F'każ li l-perjodu ta' osservazzjoni jiġi pprolongat jeħtieġ li jkun hemm valutazzjonijiet oħra f'intervalli ta' 24 s sa ħin massimu ta' 96 s, CASemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

Għandu jkun hemm stima ta' l-ikel ikkonsmat minn kull grupp. Pargun bejn ir-rati ta' konsumazzjoni ta' ikel trattat u dak mhux trattat matul is-6 s imsemmija jista' jipprovdi informazzjoni dwar il-palatabiltà ta' l-ikel trattat.

Hu neċessarju li jiġu reġistrati l-anomaliji kollha fl-imġieba osservata matul il-prova.

1.6.5. **Prova limiti**

F'ċertu każijiet (e.ż. meta jkun mistenni illi sustanza sperimentali jkollha tossiċità baxxa) tista' ssir prova limiti bl-użu ta' 100µg s.a./-naħla sabiex jintwera illi l-LD_{50} huwa akbar minn minn dan il-valur. L-istess proċedura għandha tintuża, inklużi t-tliet gruppi repliċi, għad-doża sperimentali, għall-kontrolli rilevanti, għall-istima ta' l-ammont ta' ikel ikkonsmat, u għall-użu ta' l-istandard tossiku. Jekk iseħħu każijiet ta' mortalità, irid isir studju komplet. Jekk jiġu osservati effetti subletali (ara taqsima 1.6.4), dawn għandhom jiġu reġistrati.

▼B

2. *DATA* U RAPURTAĠĠ

2.1. DATA

Id-*data* għandha tiddaħħal fil-qosor f'tabella li turi n-numru ta' naħal użat kif ukoll il-mortalità f'kull osservazzjoni u n-numru ta' naħal b'imġieba anomala għal kull grupp ta' trattament, ta' kontroll u relattiv għas-sustanza tossika standard. Sabiex tiġi analizzata d-*data* tal-mortalità jeħtieġ li jintużaw metodi statistiċi xierqa (e.ż. analiżi probit, medja mobbli, probbabiltà binomali) (3) (4). Jeħtieġ li jiġu mpinġija kurvi doża-tweġiba għal kull żmien ta' osservazzjoni rakkomandat u li tiġi kkalkolata l-mejla tal-kurvi u d-doża letali medji (LD_{50}) b'limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Il-korrezzjonijiet għall-mortalità bejn il-kontrolli jistgħu jiġu effettwati skond il-metodu ta' Abbott (4) (5). Meta l-ikel trattat ma jiġix ikkonsmat totalment, għandha tiġi determinata d-doża tas-sustanza sperimentali kkonsmata f'kull grupp. Il-LD_{50} għandha tiġi espressa f'ig tas-sustanza sperimentali kull naħla.

2.2. RAPPORT TAL-PROVA

Ir-rapport tal-prova irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Sustanza sperimentali:**

— natura fiżika u propjetà fiżjokimika rilevanti (e.ż. stabilità fl-ilma, pressjoni tal-fwar),

— data kimika ta' identifikazzjoni, inkluża formula ta' struttura, purezza (i.e. għall-pestiżidi, l-identità u l-konċentrazzjoni ta' sustanza(/i) attiva(/i).

2.2.2. **Speċi sperimentali:**

— isem xjentifiku ta' l-ispeċi, razza, età approssimattiva (f'ġimgħat), metodu u data tal-ġabra,

— informazzjoni fuq kolonji użati għall-ġbir tan-naħal għall-isperimentazzjoni inkluż is-saħħa, eventwali mard ta' l-eżemplari adulti, eventwali pretrattamenti, eċċ.

2.2.3. **Kondizzjonijiet sperimentali:**

— temperatura u umdità relattiva tal-kamra sperimentali,

— kondizzjonijiet tal-housing inklużi t-tip, il-qies u l-materjal tal-gaġġa,

— metodi tal-preparazzjoni tar-riżerva u tas-sustanza sperimentali (meta jintuża, is-solvent u l-konċentrazzjoni tiegħu għandha tingħata), metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tar-riżerva u l-frekwenza tat-tiġdid (meta jintuża, l-aġent li jħoll u l-konċentrazzjoni tiegħu għandha tingħata),

— disinn sperimentali, e.ż. numru u konċentrazzjonijiet sperimentali użati, numru ta' kontrolli; għal kull konċentrazzjoni sperimentali u kontroll, numru ta' repliċi ta' gaġġeġ u numru numru ta' naħal f'kull gaġġa,

— data tal-prova.

▼B

2.2.4. **Riżultati:**

— riżultati ta' l-istudju preliminari tar-riċerka tal-firxa, jekk magħmul,

— *data* primarja: mortalità għal kull doża ttestjata f'kull ħin ta' osservazzjoni,

— grafika tal-kurvi doża-tweġiba fl-aħħar tal-prova,

— valuri ta' l-LD_{50} b'limiti ta' affidabilità with 95 %, għal kull ħin rakkomandat għall-osservazzjoni għas-sustanza tal-prova u għas-sustanza tossika standard,

— proċeduri statistiċi użati biex jistabilixxu l-LD_{50},

— mortalità bejn il-kontrolli,

— effetti oħra bioloġiċi osservati jew imkejla e.ż. mġieba anomala tan-naħal (inkluż ir-rifjut tad-doża sperimentali), rata tal-konsumazzjoni ta' l-ikel f'gruppi trattati u gruppi mhux trattati,

— devjazzjoni eventwali mill-proċedura tal-metodu sperimentali hawn deskritti u informazzjoni eventwali oħra rilevanti.

3. **REFERENZI**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. NAĦAL – PROVA TA' TOSSIĊITÀ AKUTA MILL-KUNTATT

1. METODU

Dan il-metodu ta' prova ta' tossiċità akuta huwa replika ta' l-OECD TG 214 (1998).

1.1. DAĦLA

Din il-prova ta' tossiċità huwa metodu li jintuża fil-laboratorju, magħmul biex issir stima tat-tossiċità mill-kuntatt akuta tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti u kimiċi oħra, lin-naħal adult li jkun qiegħed jaħdem.

Fl-istima u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' tas-sustanzi, d-determinazzjoni ta' tossiċità akuta mill-kuntatt fin-naħal tista' tukun meħtieġa, eż. meta jkun probabbli li n-naħal jiġi espost għal xi kimika. Din il-prova ta' tossiċità mill-kuntatt akuta jsir sabiex tiġi determinata it-tossiċità intrinsika ta' pestiċidi u kimiċi oħra għan-naħal. Ir-riżultati ta' din il-prova għandhom jintużaw biex jiġi definit il-bżonn għal evalwazzjoni ulterjuri. B'mod partikolari, dan il-metodu jista' jintuża f'programmi mqassma f'aktar minn fażi waħda sabiex jiġu determinati il-ħsarat tal-pestiċidi għan-naħal, ibbażat fuq sekwenza ta' provi ta' tossiċità ġol-laboratorju għal-esperimenti fuq is-semikamp u fuq il-kamp (1). Il-pestiċidi jistgħu jiġu ittestjati bħala sustanzi attivi (s.a.) jew bħala prodotti fformulati.

L-istandard tossiku għandu jiġi stabbilit sabiex tiġi vverifikata s-sensittività tan-naħal u l-preċiżjoni tal-prova proċedurali.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċità orali akuta: hija l-effett avvers li jseħħ f'perjodu massimu ta' 96 siegħa ta' applikazzjoni topika ta' dosa singola ta' sustanza sperimentali.

Doża: hija l-ammont tas-sustanza applikata. Id-doża hija espressa bħala l-massa (μg g) tas-sustanza sperimentali għal kull annimal sperimentali (μg/bee).

LD_{50} (doza letli medja) mill-kuntatt: hija doża singola ta' sustanza miġjuba statistikament li tista' tikkawża l-mewt f'50 % ta' l-annimali meta tiġi somministrata mill-kuntatt. Il-valur ta' l-LD_{50} huwa espress bħala μg) tas-sustanza sperimentali kull naħla. Fil- każ tal-pestiċidi, is-sustanza sperimentali tista' tkun kemm sustanza attiva (s.a.) kif ukoll prodott formulat li jkunu fih wieħed jew aktar sustanzi attivi.

Mortalità: annimal huwa registrat mejjet meta ikun kompletament immobbli.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-PROVA

Naħal ħaddiema adulti (*Apis mellifera*) huma esposti għal firxa ta' dożijiet tas-sustanza sperimentali maħlula f'trasportaturi xierqa, b'applikazzjoni diretta mas-sider (taqtir). Il-prova ddum 48 s. Jekk ir-rata tal-mortalità tkun qed tiżdied bejn 24 s u 48 s filwaqt illi l-mortalità tal-kontrolli tibqa' f'livell aċċettabbli, i.e. ≤ 10 %, ikun xieraq illi l-prova tiġi estiża għal massimu ta' 96 s. Il-mortalità għandha tiġi reġistrata kull jum u pparagunata mal-valur tal-kontroll. Ir-riżultati jiġu analizzati sabiex jiġi kkalkulat l-LD_{50} fl-24 s u t-48 s u, fil-każ li l-istudju jiġi pprolongat, fit-72 s u fis-96 s.

▼B

1.4. VALIDITÀ TAL-PROVA

Sabiex prova tkun valida, japplikaw l-kondizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità medja għan-numru totali ta' kontrolli m'għandux jeċċedi 10 % fl-aħħar tal-prova,

— l-LD_{50} ta' l-istandard tossiku jilħaq il-firxa speċifikata.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-PROVA

1.5.1. **Kollezzjoni ta' naħal**

Jintużaw naħal ħaddiema żgħażagħ adulti, i.e. naħal ta' l-istess età, mitmugħa bl-istess mod, ta' l-istess razza eċċ. In-naħal għandu jinkiseb minn kolonji li għandhom reġina, li huma mitmugħin tajjeb, u sakemm dan ikun possibbli, li jkunu eżenti minn mard, b'storja u stat fiżjoloġiku magħruf. Jistgħu jiġu miġbura filgħodu l-jum tal-prova jew filgħaxija ta' qabel il-prova u miżmuma fil-kondizzjonijiet tal-prova sal-ġurnata ta' wara. Jistgħu jintużaw ukoll naħal miġbura minn għamliet bla duqqajs. Għandhu jiġi evitat l-ġbir fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-ħarifa peress illi matul dan iż-żmien n-naħal ibiddel l-istat fiżjoloġiku tiegħu. Jekk il-provi jkollom jsiru fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-ħarifa, in-naħal jistgħu jitpoġġew f'inkubatur u mrobbija għal ġimgħa b' "ħobż tan-naħal" (pollinu miġbur mix-xehdiet) u soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal li jiġi trattat b'sustanzi kimiċi, bħal m'huma antibiotiċi, prodotti anti-varroa, eċċ., m'għandux jintuża għal provi ta' tossiċità qabel erba' ġimgħat mit-tmiem ta' l-aħħar trattament.

1.5.2. **Kondizzjonijiet ta' manteniment u alimentazzjoni**

Jintużaw gaġġeġ li jitnaddfu faċilment u li għandhom ventilazzjoni tajba. Kull materjal xieraq jista' jintuża, e.ż. azzar stainless, xbieki tal-ħadid, plastik jew gaġġeġ ta' l-injam disposable, eċċ. Il-qies tal-gaġġeġ sperimentali għandu jkun xieraq għan numru ta' naħal, i.e. jipprovdi spazju adegwat. In-numru idejali huwa ta' gruppi ta' għaxar naħliet f'kull gaġġa.

In-naħal għandu jinżamm fid-dlam ġewwa kamra sperimentali f'temperatura ta' 25 ± 2 °C. L-umdità relattiva, normalment madwar 50-70 %, għandha tiġi reġistrata matul il-prova kollha. Proċeduri ta' manipolazzjoni, inklużi t-trattamenti u l-osservazzjonijiet jistgħu jsiru fid-dawl (naturali). L-alimentazzjoni tikkonsisti f'soluzzjoni ta' sukrosju fl-ilma b'konċentrazzjoni finali ta' 500 g/l (50 % w/v) u għandha tingħata *ad libitum* matul iż-żmien tal-prova, permezz ta' kontenitur għall-ikel tan-naħal. Dan jista' jkun pipetta tal-ħġieġ (madwar 50 mm twila u 10 mm wiesgħa bin-naħa l-miftuħa li tidjieq għal djametru ta' madwar 2 mm).

1.5.3. **Preparazzjoni tan-naħal**

In-naħal miġbur jista' jiġi illoppjat b'carbon dioxide jew nitrogen għall-applikazzjoni tas-sustanza sperimentali. L-ammont ta' loppju użat u l-ħin ta' espożizzjoni għandu jiġi minimizzat. Qabel ma tinbeda l-prova jeħtieġ illi jitneħħa n-naħal li jkun qiegħed imut u li jiġi sostitwit minn naħal b'saħħithom.

1.5.4 **Preparazzjoni tad-doża**

Is-sustanza sperimentali għandha tiġi applikata bħalha soluzzjoni ġo trasportatur, i.e. solvent organiku jew soluzzjoni bl-ilma b'aġent li jxarrab, huwa preferibbli l-acetone imma jistgħu jintużaw ukoll solventi organiċi oħra li għandhom livell ta' tossiċità baxxa għan-naħal (e.ż. dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Għal dawk il-prodotti formulati mitlufa fl-ilma u s-sostanzi organiċi altament polari li ma jinħallux f'solventi organiċi jista' jirriżulta aktar faċli biex jiġu applikati jekk preparati f'soluzzjoni debboli ta' agent li jxarrab kummerċjali (e.ż. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Sustanzi xierqa għall-kontroll għandhom jitlestew, i.e. meta solvent jew dispersant jintuża biex iħoll is-sustanza sperimentali, għandhom jintużaw żewġ gruppi ta' gruppi ta' kontroll, wieħed trattat bl-ilma, u wieħed trattat b'is-solvent/id-dispersant.

1.6. PROĊEDURA

1.6.1. **Gruppi sperimentali u gruppi għall-kontroll**

In-numru ta' dożi u ta' repliċi ttestjati għandhom ikunu konformi mar-rekwiżiti statistiċi għad-determinazzjoni ta' l-LD_{50} mal-limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Normalment, għall-prova jeħtieġu ħames dożi f'serie ġeometrika, b'fatturi li ma jaqbżux 2.2, u li jkopru l-firxa għall- LD_{50}. Madankollu, għandhom jiġu determinati n-numru ta' dożi b'relazzjoni ma' kemm tkun immejla l-kurva tat-tossiċità (doża kontra mortalità) u għandu jiġi ikkunsidrat il-metodu statistiku li ġie magħżul għall-analiżi tar-riżultati. Prova ta' riċerka fuq il-firxa tippermetti li jintgħażlu d-dożi appropjati.

Minimu ta' tlett gruppi ta' provi repetuti, kull wieħed ta' tlett naħliet, għandu jiġi dożat b'kull konċentrazzjoni sperimentali.

Oltre s-serje sperimentali hu neċessarju li jiġu analizzati minimu ta' tlett lottijiet ta' kontroll, kull waħda ta' 10 naħliet. Jekk jintuża solvent organiku jew aġent li jxarrab tlett gruppi ta' kontroll addizzjonali ta' 10 naħliet kull wieħed iridu jiġu inklużi għas-solvent jew għall-aġent li jxarrab.

1.6.2. **Sustanza tossika standard**

Fis-serje sperimentali għandha tiġi inkluża sustanza tossika standard. Jeħtieġ li jintgħażlu mill-anqas tlett dożi li jkopru l-valur mistenni ta' LD_{50}. Għal kull doża sperimentali jintużaw mill-inqas tlett gaġġeġ repliċi, kull waħdha fiha 10 naħliet. Is-sustanza tossika standard preferuta hija d-dimethoate, fejn l- LD_{50} - 24 s mill-kuntatt rrapurtat huwa fil-firxa ta' 0,10 - 0,35 µg s.a./naħla (2). Madankollu, huma ukoll aċċettabbli sustanżi tossiċi standard oħra jekk data suffiċenti tkun tista' tinġieb sabiex tiġi vverifikata r-risposta mistennija rigward id-dożi(e.ż. parathion).

1.6.3. **Espożizzjoni**

1.6.3.1. *Somministrazzjoni tad-dożi*

Naħal illoppjat jiġi trattat individwalment permezz ta' applikazzjoni topika. In-naħal huwa assenjat saltwarjament għad-dożi sperimentali u kontrolli differenti. Permezz ta' mikroapplikatur għandu jiġi applikat volum ta' 1 µl tas-soluzzjoni li jkun fiha s-sustanza sperimentali bil-konċentrazzjoni xierqa fin-naħa tad-dahar tas-sider ta' kull naħla. Jekk ġustifikati, volumi oħra jistgħu jintużaw. Wara l-applikazzjoni, in-naħal jiġu allokati ġol-gaġġeġ sperimentali u mitmugħa b'soluzzjonijiet tas-sukrosju.

1.6.3.2. *Tul ta' żmien*

Preferibbilment, il-prova għandha ddum 48 s. Jekk il-mortalità tiżdied għal aktar minn 10 % bejn 24 s u 48h, d-durata tal-prova għandha tiġi estiża għal massimu ta' 96 s CASemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

▼B

1.6.4. **Osservazzjonijiet**

L-mortalità tiġi reġistrata 4 s wara l-applikazzjoni u sussegwentement wara 24 s u wara 48 s. F'każ li l-perjodu ta' osservazzjoni jiġi pprolongat jeħtieġ li jkun hemm valutazzjonijiet oħra f'intervalli ta' 24 s sa ħin massimu ta' 96 s, sakemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

Hu neċessarju li jiġu reġistrati l-anomaliji kollha ta' l-imġieba osservata matul il-prova.

1.6.5. **Prova limiti**

F'ċertu każijiet (e.ż. meta jkun pretiż illi sustanza sperimentali jkollha tossiċità baxxa) tista' ssir prova limiti bl-użu ta' 100 μg s.a./naħla sabiex jintwera illi l-LD_{50} huwa akbar minn minn dan il-valur. L-istess proċedura għandha tintuża, inklużi t-tlett gruppi repliċi, għaddoża sperimentali, għall-kontrolli rilevanti, u għall-użu ta' l-istandard tossiku.If mortalities occur, a full study should be conducted. Jekk jiġu osservati effetti subletali (ara taqsima 1.6.4), dawn għandhom jiġu reġistrati.

2. ***DATA*** **U RAPURTAĠĠ**

2.1. DATA

Id-data għandha tiġi mqassra ġo tabella li turi n-numru ta' naħal użat kif ukoll il-mortalità f'kull osservazzjoni u n-numru ta' naħal b'imġieba anomala għal kull grupp ta' trattament, ta' kontroll u relattiv għas-sustanza tossika standard. Sabiex tiġi analizzata d-*data* tal-mortalità jeħtieġ li jintużaw metodi statistiċi xierqa (e.ż. analiżi probit, medja mobbli, probbabiltà binomali) (3) (4). Il-kurvi għal *plot dose-response* f'kull ħin ta' osservazzjoni rakkomandat (i.e. 24 s, 48 s u, jekk inhu relevanti, 72 s, 96 s) u kkalkula l-kurvi u l-medja tad-doża letali (LD_{50}) b'95 % ta' limiti ta' kunfidenza. Il-korrezzjonijiet għall-mortalità bejn il-kontrolli jistgħu jiġu effetwati skond il-metodu ta' Abbott (4) (5). Il- LD_{50} għandha tiġi espressa f'ìg tas-sustanza sperimentali kull naħla.

2.2. RAPPORT TAL-PROVA

Ir-rapport tal-prova irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. **Sustanza sperimentali:**

— natura fiżika u propjetà fiżjo-kimika rilevanti (e.ż. stabilità fl-ilma, pressjoni tal-fwar),

— *data* kimika ta' identifikazzjoni, inkluża formula ta' struttura, purezza (i.e. għall-pestiżidi, l-identità u l-konċentrazzjoni ta' sustanza(/i) attiva(/i).

2.2.2. **Speċi sperimentali:**

— isem xjentifiku ta' l-ispeċi, razza, età approssimattiva (f'ġimgħat), metodu u data tal-ġabra,

— informazzjoni fuq kolonnji użati għall-ġbir tan-naħal għall-esperimentazzjoni inkluż is-saħħa, mard eventwali ta' l-eżemplari adulti, eventwali pretrattamenti, eċċ.

▼B

2.2.3. **Kondizzjonijiet sperimentali:**

— temperatura u umdità relattiva tal-kamra sperimentali,

— kondizzjonijiet tal-housing inklużi t-tip, il-qies u l-materjal tal-gaġġa,

— metodu ta' amministrazzjoni tas-sustanza sperimentali, e.ż. solvent trasportatur użat, volum tas-soluzzjoni sperimentali applikat, loppju użat,

— disinn sperimentali, e.ż. numru ta' dożi sperimentali użati, numru ta' kontrolli; għal kull doża sperimentali u kontroll, numru ta' repliċi ta' gaġġeġ u numru ta' naħal f'kull gaġġa,

— data tal-prova.

2.2.4. **Riżultati:**

— riżultati ta' l-istudju preliminari tar-riċerka tar-range, jekk magħmul,

— data primarja: mortalità għal kull doża ttestjata f'kull ħin ta' osservazzjoni,

— grafika tal-kurvi doża-tweġiba fl-aħħar tal-prova,

— valuri ta' l- LD_{50} b'limiti ta' affidabilità with 95 %, għal kull ħin rakkomandat għall-osservazzjoni għas-sustanza tal-prova u għas-sustanza tossika standard,

— proċeduri statistiċi użati biex jistabilixxu l- LD_{50},

— mortalità bejn il-kontrolli,

— effetti oħra bioloġiċi osservati jew imkejla e.ż. mġieba anomala tan-naħal,

— eventwali devjazzjoni mill-proċedura tal-metodu sperimentali hawn deskritti u eventwali informazzjoni oħra rilevanti.

3. **REFERENZI**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. **ADSORBIMENT/DESORBIMENT BL-UŻU TAL-METODU TA' L-EKWILIBRIJU TA' GRUPPI**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika ta' l-OECD TG 106, għad-Determinazzjoni ta' l-Assorbiment/Desorbiment tal-ħamrija, bl-użu ta' Metodu ta' Eqwilibriju ta' Gruppi (2000).

1.1. DAĦLA

Fl-elaborazzjoni tal-metodu preżenti, ingħata każ tar-riżultati ta' sperimentazzjoni ċirkolari u ta' workshop għall-għażla tal-ħamrija għall-iżvilupp ta' prova ta' l-adsorbiment (1) (2) (3) (4) kif ukoll linji gwida eżistenti fuq livell nazzjonali (5) (5) (6) (7) (8) (9) (10).

L-istudji fuq l-adsorbiment/desorbiment huma utli sabiex tinkiseb informazzjoni essenzali fuq il-mobilità tal-komposti kimiċi u d-distribuzzjoni tagħhom fil-ħamrija, fl-ilma u fl-arja tal-biosfera (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Din l-informazzjoni tista' tkun utli, pereżempju, sabiex wieħed ikun jista' jobsor jew jagħmel stima tad-disponibbiltà ta' prodott kimiku taħt aspetti varji: degredazzjoni (22) (23), trasformazzjoni u assimilazzjoni ta' l-organiżmi ħajjin (24); filtrazzjoni minn ġol-profil tal-ħamrija (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); volatilità mill-ħamrija (21) (29) (30); passaġġ mill-wiċċ ta' l-art għall-ilmijiet naturali (18) (31) (32). Id-data fuq l-adsorbiment tistà tintuża għall-skopijiet ta' paragunar u ta' mudellar (19) (33) (34) (35).

Id-distribuzzjoni ta' prodott kimiku bejn il-ħamrija u fażijiet li fihom l-ilma huwa proċess ikkomplikat li jiddependi fuq numru ta' fatturi differenti: in-natura kimika tas-sustanza (12) (36) (37) (38) (39) (40), il-karatteristiċi tal-ħamrija (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), u l-fatturi klimatiċi bħal ma huma l-inżul taxxita, it-temperatura, id-dawl tax-xemx u r-riħ. Għaldaqstant, il-fenomeni numeruži u l-mekkaniżmi involuti fil-proċess ta' l-adsorbiment tal-ħamrija ta' sustanza kimika ma jistgħux jiġu definiti kompletament permezz ta' mudell simplifikat tal-laboratorju bħal m'hu il-metodu preżenti. Madankollu, anke jekk dan l-attentat ma jkunx jista' jkopri l-każijiet ambjentali kollha possibbli, jipprovdi informazzjoni ta' valur fuq ir-rilevanza ambjentali ta' l-adsorbiment ta' sustanza kimika.

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2. AMBITU

L-għan ta' dan il-metodu huwa li jivvaluta l-imġieba ta' l-adsorbiment/desorbiment ta' sustanza fuq il-ħamrija. L-għan huwa li jinkiseb valur ta' sorbiment li jkun jista' jintuża biex tinbasar partizzjoni taħt varjetà ta' kondizzjonijiet ambjentali; għal dan l-għan, għal kull prodott kimiku li jiġi meqjus, jiġu ddeterminati l-koeffiċjent ta' adsorbiment għall-ekwilibriju fuq tipi ta' ħamrija differenti bħala funzjoni tal-karatteristiċi tal-ħamrija stess (e.ż. kontenut karboniku organiku, kontenut ta' tafal u struttura tal-ħamrija u pH). Tipi differenti ta' ħamrija għandhom jintużaw sabiex ikopru bl-aktar mogħod wiesgħa possibbli l-interazzjonijiet ta' sustanza magħrufa ma' ħamrija li tiġri b'mod naturali.

F'dan il-metodu, l-adsorbiment jirrapreżenta l-proċess ta' vinkolazzjoni ta' sustanza kimika mal-wiċċ tal-ħamrija; ma tiddistingwix bejn proċessi differenti ta' adsorbiment (adsorbiment fiżiku u kimiku) u proċessi oħra bħad-degredazzjoni katalitika fil-wiċċ, l-adsorbiment bil-massa jew r-reazzjoni kimika. M'għandux jingħata każ ta' l-adsorbiment li jseħħ fuq il-partiċelli kolloidali (djametru < 0,2 μìm) ġenerati mill-ħamrija.

▼B

Il-parametri tal-ħamrija meqjusa l-aktar importanti għall-adsorbiment huma: kontenut karboniku organiku (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); kontenut ta' tafal u struttura tal-ħamrija (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) u pH għall-kompost ionizzabbli (3) (4) (42). Parametri oħra tal-ħamrija li jista' jkollhom impatt fuq l-adsorbiment/desorbiment ta' sustanza partikolari huma l-kapaċità effettiva ta' l-iskambju katjoniku (ECEC), il-kontenut ta' ossidi amorphous tal-ħadid u tal-aluminjum, partikolarment għal ħamrija volkanika u tropikali (4), kif ukoll il-wiċċ speċifiku (49).

Din il-prova hija magħmula biex tevalwa l-adsorbiment ta' prodotti kimiċi fuq tipi differenti ta' ħamrija differenti b'rage ta' kontenut karboniku organiku, kontenut ta' tafal u struttura tal-ħamrija, u pH li jvarja. Dan jikkonsisti f'tlett stadji:

Stadju 1: Studju preliminarju sabiex jiġi determinat:

— ir-rapport ħamrija/soluzzjoni,

— il-ħin ta' l-ekwilibriju għall-adsorbiment u l-ammont tas-sustanza sperimentali adsorbita f'l-ekwilibriju,

— l-adsorbiment tas-sustanza sperimentali fl-uċuħ tar-reċipjenti u l-istabilità tas-sustanza sperimentali matul il-perjodu sperimentali.

Stadju 2: Screening prova: l-adsorbiment huwa studjat f'ħames tipi differenti ta' ħamrija permezz ta' kinetika ta' adsorbiment ta' konċentrazzjoni singola u determinazzjoni tal-koeffiċjenti K_d u K_{oc}.

Stadju 3: Determinazzjoni ta' l-iżotermi ta' adsorbiment ta' Freundlich biex tiġi stabbilità l-influwenza tal-konċentrazzjoni fuq id-daqs ta' l-adsorbiment fuq il-ħamrija.

Studju tad-desorbiment permezz tal-kinetika ta' desorbiment/ta' l-iżotermi ta' adsorbiment ta' Freundlich (Anness 1).

1.3. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
A_{t_i}	persentaġġ ta' adsorbiment fil-ħin t_i	%
A_{eq}	persentaġġ ta' adsorbiment fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fil-ħin t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija matul l-intervall ta' ħin Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija f'l-equilibriju ta' l-adsorbiment	µg
m_0	massa tas-sustanza sperimentali fil-pipetta, fil-bidu tal-prova ta' l-adsorbiment	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali mkejla f'alikwota (v_a^A)fil-ħin t^i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa tas-sustanza fis-soluzzjoni f'l-ekwilibriju ta' l-assorbiment	µg
m_{soil}	kwantità tal-faża ħamrija, espressa f'massa ta' ħamrija xotta	g

▼B

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
C_{st}	konċentrazzjoni ta' massa tas-soluzzjoni ta' riżerva tas-sustanza	μg cm^{-3}
C_0	konċentrazzjoni inizjali tal-massa tas-soluzzjoni sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija	μg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-faża bl-ilma fil-ħin t_i, meta issir l-analiżi	μg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	kontenut tas-sustanza adsorbità fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	μg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-faża bl-ilma fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	μg cm^{-3}
V_0	volum inizjali tal-faża bl-ilma f'kuntatt ma' l- ilma matul il-prova ta' adsorbiment	cm^3
v_a^A	volum ta' l-alikwota fejn tiġi mkejla s-sustanza sperimentali	cm^3
K_d	koeffiċjent ta' distribuzzjoni għall-adsorbiment	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	koeffiċjent ta' adsorbiment normalizzat għall-karbonju organiku	cm^3 g^{-1}
K_{om}	koeffiċjent ta' distribuzzjoni normalizzat għas-sustanza organika	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	koeffiċjent ta' adsorbiment skond Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) 1/n g-1
1/n	esponenti ta' Freundlich	
D_{t_i}	persentaġġ ta' desorbiment fil-ħin t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	persentaġġ ta' desorbiment matul l-intervall ta' ħin Δt_i	%
K_{des}	koeffiċjenti apparenti ta' desorbiment	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	koeffiċjenti ta' desorbiment skond Freundlich	μg $^{1-1/n}$ (cm^3) 1/n g-1
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija fil-ħin t_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija matul l-intervall ta' ħin Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	Il-massa tas-sustanza determinata b'mod analitiku fil-faża akwea f'ekwilibriju ta' *desorption*	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	Il-massa totali tas-sustanza għat-test li ġie *desorbed* f'ekwilibriju ta' *desorption*	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza li tibqa adsorbita fuq il-ħamrija wara l-intervall ta' ħin Δt_i	μg
m_{aq}^A	massa tas-sustanza residwa mill-ekwilibriju ta' adsorbiment minħabba sostituzzjoni mhux kompluta tal-volum	μg
$C_s^{des}(eq)$	kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa' adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment	μg g^{-1}

▼B

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
$C_{aq}^{des}(eq)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza sperimentali preżenti fil-faża bl-ilma fl-ekwilibriju tad-desorbiment	µg cm^{-3}
V_T	volum totali tal-faża bl-ilma b'kuntatt mal-ħamrija matul l-edperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment magħmul bil-metodu serje	cm^3
V_R	volum tas-supernatant mneħħi mil-pipetta wara li jintlaħaq ekwilibriju ta' adsorbiment u mibdul b'l-istess volum tas-soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volum ta' l-alikwota prelevata għal raġuni analitika mill-ħin (i), matul l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment magħmul bil-metodu serje	cm^3
$V_{ra}i^D$	volum tas-soluzzjoni prelevata mill-pipetta (i) biex titkejjel is-sustanza sperimentali, matul l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment (metodu paralleli)	cm^3
V_r^F	volum tas-soluzzjoni prelevata mill-pipetta biex titkejjel is-sustanza sperimentali, fl-ekwilibriju tad-desorbiment	cm^3
MB	bilanċ tal-massa	%
m_E	massa totali tas-sustanza sperimentali estratta f'żewġ stadji, mill-ħamrija u mill-ħitan tar-reċipjent	µg
V_{rec}	volum tas-supernatant miġbur wara li ntlaħaq l-fl-ekwilibriju tad-adsorbiment	cm^3
P_{ow}	koeffiċjent tar-ripartizzjoni octanol/ilma	
pKa	kostanti tad-disoċjazzjoni	
S_w	solubilità fl-ilma	g l^{-1}

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU SPERIMENTALI

Volumi magħrufa ta' soluzzjonijiet tas-sustanza sperimentali, mhux markata jew radjumarkata, b'konċentrazzjonijiet magħrufa 0,01 M $CaCl_2$ huma miżjuda ma' kampjuni ta' ħamrija ta' piż xott magħruf li kienu ekwilibrati qabel f'0,01 M $CaCl_2$ It-taħlita tiġi mħawwda għal żmien xieraq. Is-sospensjonijiet tal-ħamrija jiġu mbagħad separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u, jekk ikun mixtieq, filtrazzjoni u tiġi analizzata l-faża bl-ilma. L-ammont ta' sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija tiġi kkalkolata skond id-differenza bejn l-ammont ta' sustanza sperimentali preżenti fis-soluzzjoni mill-bidu u l-ammont li jibqa fl-aħħar ta' l-esperiment (metodu indirett).

Metodu ieħor biex tiġi determinata l-kwantità adsorbita tas-sustanza sperimentali huwa billi tiġi analizzata direttament il-ħamrija (metodu dirett). Din il-proċedura li teħtieġ estrazzjoni tal-ħamrija f'stadji suċċessivi permezz ta' solvent xieraq, hija rakkomandata f'każijiet fejn id-differenza fil-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tas-sustanza ma tistax tiġi determinata preċiżament. Eżempji ta' dawn il-każijiet huma: l-adsorbiment tas-sustanza sperimentali fil-wiċċ tar-reċipjenti fejn isir l-esperiment, instabilità tas-sustanza sperimentali matul il-ħin ta' l-esperiment, adsorbiment debboli li jagħti biss lok għal varjazzjonijiet żagħar ta' konċentrazzjoni fis-soluzzjoni; u adsorbiment qawwi li jwassal għal konċentrazzjonijiet baxxi li ma jistgħux jiġu determinati akkuratament. Jekk tintuża sustanza radjumarkata, l-estrazzjoni tal-ħamrija tista' tiġi evitata permezz ta' analiżi tal-faża ħamrija permezz tat-teknika tal-kombustjoni u l-għadd suċċessiv tax-xintillazzjoni fil-faża likwida. Madankollu, l-għadd tax-xintillazzjoni fil-faża likwida huwa metodu ta' teknika mhux speċifiku li ma jagħmilx distinzjoni bejn prodotti proġenituri u dawk ta' trasformazzjoni; għaldaqstant għandu jintuża biss jekk il-prodott kimiku sperimentali jibqa stabbli matul id-dewmien kollu ta' l-istudju.

▼B

1.5. INFORMAZZJONI FUQ IS-SUSTANZA SPERIMENTALI

Ir-reattivi kimiċi għandhom ikunu ta' livell analitiku. Huwa rakkomandat l-użu ta' sustanzi li ma jkunux immarkati b'kompożizzjoni magħrufa u preferibbilment purezza mhux anqas minn 95 % jew ta' sustanzi sperimentali radjumarkati li għandhom kompożizzjoni u radjupurezza magħrufa. Fil-każ ta' radjumarkaturi ta' nofsħajja qasira, għandhom jiġu applikati korrezzjonijiet adegwati.

Qabel ma ssir prova għall-adsorbiment-desorbiment, l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza sperimentali għandha tkun disponibbli:

(a) solubilità fl-ilma (A.6);

(b) tensjoni tal-fwar (A.4) u/jew il-Kostanti tal-Liġi ta' Henry;

(ċ) degradazzjoni antibjotika: idrolisi bħalha funzjoni tal-pH (C.7);

(d) koeffiċjent tar-ripartizzjoni (A.8);

(e) bijodegrabilità ta' malajr (C.4) jew trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-ħamrija;

(f) pKa tas-sustanzi ionizzabili;

(g) fotoliżi diretta fl-ilma (i.e. spectrum ta' adsorbiment UV-Vis fl-ilma, rendiment quantum) u fotodegradazzjoni fil-ħamrija.

1.6. APPLIKABBILITÀ TAL-PROVA

Din il-prova hi applikabbli għas-sustanzi kimiċi għal-liema jista' jiġi applikat metodu analitiku suffiċjentement akkurat. L-istabbilità tas-sustanza sperimentali matul il-ħin neċessarju biex titwettaq il-prova huwa parametru importanti li jista' jinfluwenza l-affidabilità tar-riżultati, speċjalment meta jiġi applikat il-metodu indirett. Għaldaqstant, huwa neċessarju li din l-istabbilità tiġi verifikata tramiti studju preliminari; jekk tiġi osservata trasformazzjoni fil-perjodu ta' ħin tal-prova, huwa rakkomandat li l-istudju prinċipali għandu jiġi eżegwit billi jiġu analizzati kemm il-fażi ħamrija kif ukoll il-fażi ta' l-ilma.

Jistgħu jinħolqu diffikultajiet meta din il-prova isir għal sustanzi li għandhom solubilità baxxa fl-ilma ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), kif ukoll għal sustanzi ta' karika elevata, dovut għall-fatt illi l-konċentrazzjoni fil-fażi bl-ilma ma tistax tiġi mkejla analitikament b'akkuratezza effiċjenti. F'dawn il-każijiet, iridu jittieħdu passi addizzjonali. Il-mod kif wieħed jista' jaffronta dawn il-problemi jista' jinstab fit-taqsima relevanti ta' dan il-metodu.

Fl-isperimentazzjoni fuq sustanzi li jiżvintaw, għandhom jittieħdu prekawzjonijiet biex telf matul l-istudju jiġi evitat.

1.7. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.7.1. **Apparat u reattivi kimiċi**

Apparat normali tal-laboratorju, speċjalment li ġej:

(a) Pipetti jew kontenituri biex isir l-esperiment. Huwa importanti li dawn il-pipetti jew kontenituri:

— joqgħodu direttament fiċ-ċentrifuga sabiex jiġi miniminizzat telf fil- manipolazzjoni u trasferiment,

— jkunu magħmula minn materjal inert, li jimminimizza l-adsorbiment fil-wiċċ tas-sustanza sperimentali.

▼B

(b) Apparat għat-taħwid: overhead shaker jew apparat ekwivalenti; l-apparat għat-taħwid għandu jżomm il-ħamrija sospiża matul it-taħwid.

(ċ) Ċentrifuga: preferibbilment ta' veloċità għolja, e.ż. forza ċentrifuga > 3 000 g, temperatur kontrollata, kapaċi tneħħi partiċelli b'djametru akbar minn 0,2 μm minn soluzzjonijiet bl-ilma. Sabiex jiġi evitat telf dovut għal volatilità jew ta' ilma, dawn il-kontenituri għandhom jinżammu mgħottija matul iċ-ċentrifugazzjoni u t-taħwid; biex jiġi minimizzat l-adsorbiment fuq l-għotjien, dawn iridu jiġu diżattivati pereżempju għotjin mgħottija bit-teflon.

(d) Fakultattiv: apparat għall-filtrazzjoni; filtri ta' porożità ta' 0,2 μm, sterili, għal użu wieħed. Kura speċjali għandha tingħata għall-għażla tal-materjal għall-filtrazzjoni sbiex telf eventwali tas-sustanza sperimentali minn dan il-materjal jiġi evitat; għal dawk is-sustanzi li ma jinħallux malajr, mhux opportun li jintuża materjal għall-filtrazzjoni organiku.

(e) Strumentazzjoni analitika, adatta biex titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika sperimentali.

(f) Forn tal-laboratorju, kapaċi jżomm temperatura ta' 103 °C sa 110 °C.

1.7.2. **Karatterizzazzjoni u selezzjoni tal-ħamrija**

Il-ħamrija għandha tiġi karatterizzata minn tlett parametri li huma meqjusa maġġorment responsabbli għall-kapaċitaà ta' l-adsorbiment: karbonju organiku, kontenut f'tafal u struttura tal-ħamrija, u pH. Kif diġà msemmi (ara Skop) għandhom jiġu meqjusa propjetajiet fiżiko-kimiċi oħra tal-ħamrija li jista' jkollhom impatt fuq l-adsorbiment/-desorbiment ta' sustanza partikolari.

Il-metodi użati għall-karatterizzazzjoni tal-ħamrija huma importanti ħafna u jistà jkollhom influwenza sinifikattiva fuq ir-riżultati. Għal-daqstant, huwa rakkomandat illi l-pH tal-ħamrija għandha titkejjel f'soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$ (iġifieri fis-soluzzjoni użata għall-prova ta' l-adsorbiment/desorbiment) skond il-metodu ISO li jikkor-rispondi (ISO-10390-1). Huwa rakkomandat ukoll illi jiġu determinati l-popjetajiet rilevanti l-oħra tal-ħamrija skond metodi standard (pereżempju ISO 'Manwal ta' l-Analiżi tal-Ħamrija'); dan jippermetti illi l-analiżi tad-data fuq is-sorbiment tkun ibbażata fuq parametri tal-ħamrija standardizzati globalment. Ir-refernzi (50-52) jagħtu xi indikazzjonijiet fuq il-metodi standard disponibbli għall-analiżi u għall-karatterizzazzjoni tal-ħamrija. Għall-kalibrazzjoni tal-metodi sperimentali tal-ħamrija, huwa rakkomandat l-użu ta' ħamrija ta' referenza.

It-Tabella 1 tagħti indikazzjoni għall-għażla tal-ħamrija għall-esperimenti ta' l-adsorbiment/desorbiment. Is-seba' kwalitajiet ta' ħamrija magħżula ikopru l-kwalitajiet li jinstabu f'żoni ġeografiċi temperati. Meta s-sustanzi sperimentali ikunu ionizzabbli, il-kwalitajiet ta' ħamrija magħżula għandhom ikopru range wiesgħa ta' pH, sabiex ikun jista' jiġi evalwat l-adsorbiment tas-sustanza fil-forma ionizzata u dik mhux ionizzata. Indikazzjoni fuq kemm il-kwalità ta' ħamrija għandha tintuża fl-istadji varji tal-prova tinstab taħt 1.9. Eżekuzzjoni tal-prova.

Jekk jiġu preferuti kwalitajiet oħra ta' ħamrija, għandhom jiġu karatterizzati permezz ta' l-istess parametri u għandu jkollhom varjazzjoni simili fil-propjetajiet għal dawk deskritti f'Tabella 1, anke jekk ma jaqblux eżattament mal-kriterji.

▼B

Tabella 1:

Gwida għas-selezzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija għall-adsorbiment-desorbiment

Kwalità ta' ħamrija	Range ta' pH (f'0,01 M $CaCl_2$)	Kontenut f'karbonju organiku (%)	Kontenut f'tafal (%)	Komposizzjoni tal-ħamrija (*)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 – 80	tafal
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 – 40	art taflija
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 – 25	art imtajjna
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 – 30	art tajba u għammiela
5	< 4,0 - 6,0	< 0,5 - 1,5	< 10 – 15	art imrammla
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0	40 – 65	art taflija/tafal
7	< 4,5	> 10	< 10	ramel/art imrammla

(*) Skond il-FAO u s-sistema US (85).
Il-varjabbli rispettivi għandhom juru preferebbilment il-valuri fil-medda mogħtija. Jekk, madankollu, ikun hemm diffikultajiet fis-sejba tal-materjal ta' ħamrija xieraq, il-valuri taħt il-minimu indikat huma aċċettati.
Il-ħamrija b'inqas minn 0,3 % tal-karbonju organiku tista' tfixkel il-korrelazzjoni bejn il-kontenut organiku u ta' adsorbiment. Għalhekk, huwa rakkomandat l-użu tal-ħamrija li fiha kontenut minimu ta' karbonju organiku ta' 0,3 %.

1.7.3. **Kollezzjoni u ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija**

1.7.3.1. *Kollezzjoni*

Għall-kampjunaġġ mhumiex rakkomandati tekniċi jew strumenti speċifiċi; it-teknika tal-kampjunaġġ tiddependi fuq il-finalità ta' l-istudju (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Għandu jitqies dan li ġej:

(a) informazzjoni dettaljata fuq l-istorja ta' l-għalqa minn fejn sar il-kampjunaġġ hija neċessarja; dan jinkludi l-lokalità, il-medda vegetali, trattamenti bl-użu ta' pestiċidi u/jew fertilizzanti, żidiet bioloġiċi jew kontaminazzjoni aċċidentali. Rigward id-deskrizzjoni tal-lokalità fejn sar il-kampjunaġġ, għandhom jiġu osservati r-rakkomandazzjonijiet ta' l-standard ta' l-ISO fuq il-kampjunaġġ tal-ħamrija (ISO 10381-6);

(b) il-lokalità fejn sar il-kampjunaġġ trid tiġi definita skond il-metodu UTM (Proġettazzjoni Universali Trażversali Merkatorja/-Datum Orizzontali Ewropew) jew permezz tal-koordinati ġeografiċi tiegħu; dan jista' jippermetti rikollizzjoni ta' kwalità ta' ħamrija partikolari fil-futur jew jist' jgħin jiddefinixxi l-ħamrija taħt sistemi varji ta' klassifikazzjoni użati f'pajjiżi differenti. Ukoll, jinġabar biss l'orizzont A sa fond massimu ta' 20 ċm. Speċjalment għal-kwalità ta' ħamrija n. 7 jekk il-ħamrija tagħmel parti minn orizzont O_h, dan irid jiġi miżjud fil-kampjunaġġ.

Il-kampjuni tal-ħamrija għandhom jinġarrew permezz ta' kontenituri u taħt u f'kondizzjonijiet ta' temperatura li jiggarantixxu li l-propjetajiet oriġinali tal-ħamrija ma jiġux mibdula b'mod sinifikattiv.

▼B

1.7.3.2. *Ħażna*

L-użu ta' ħamrija prelevata reċentement huwa preferibbli. Biss meta dan ma jkunx possibbli l-ħamrija tista' tiġi maħżuna f'temperatura ambjentali u għandha tinżamm niexfa bl-arja. Għall-ħażna mhux rakkomandat l-ebda limitu ta' ħin partikolari, imma ħamrija maħżuna għal aktar minn tliet snin għandha tiġi rianalizzata qabel l-użu biex jiġi verifikat il-kontenut karboniku organiku, pH u CEC.

1.7.3.3. *Manipolazzjoni u preparazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija għall-prova*

Il-ħamrija trid tiġi mnixxfa bl-arja f'temperatura ambjentali (preferibbilment bejn 20-25 °C). Is-disgregazzjoni trid tiġi magħmula bl-anqas forza possibbli, sabiex l-istruttura oriġinali tal-ħamrija tinbidel mill-anqas possibbli. Il-ħamrija trid tintgħarbel sa qies partikolari ≤ 2 mm; skond ir-rakkomandazzjonijiet tan-norma ta' l-ISO fuq il-kampjunaġġ tal-ħamrija (ISO 10381-6). Homogenità akkurata hija rakkomandata, peress li din tkabbar ir-reproużibilità tar-riżultati. Il-kontenut ta' umdità f'kull kwalità ta' ħamrija hu determinat fuq tlett aliquoti msaħħna sa 105 °C CASemm ma jkun hemm l-ebda tibdil sinifikattiv fil-piż (approssimament 12 s). Għall-kalkoli kollha il-massa tal-ħamrija tirreferi għall-massa xxottata fil-forn, i.e. il-piż tal-ħamrija kkoreġut għall-kontenut ta' umdità tiegħu.

1.7.4. **Preparazzjoni tas-sustanza sperimentali għall-applikazzjoni għall-ħamrija**

Is-sustanza sperimentali tiġi maħlula f'soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ f'ilma distillat jew deionizzat; is-soluzzjoni ta' $CaCl_2$, użata bħala l-fażi tas-solvent bl-ilma, tiswa biex titjieb iċ-ċentrifugabilità u timminimizza l-iskambjar ta' katjoniku. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna preferibbilment għandha tkun tlett ordini ta' kobor għola mil-limitu tas-sejba tal-metodu analitiku użat. Dan il-parametru jissalvagwardja miżuri akkurati fil- każ tal-metodoloġija użata f'dan il-metodu; barra minn hekk, il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna għandha tkun inferjuri għas-solubilità tas-sustanza sperimentali fl-ilma.

Preferibbilment, is-soluzzjoni maħżuna għandha titlesta' immedjatament qabel il-ħin ta' l-applikazzjoni għall-kampjuini tal-ħamrija u għandha tinżamm magħluqa fid-dlam f'4 °C. Il-ħin tal-ħażna jiddependi fuq l-istabbilità tas-sustanza sperimentali u l-konċentrazzjoni tagħha fis-soluzzjoni.

Sustanzi lijdumu biex jinħallu biss (S_w < 10^{-4} g l^{-1}), jista' jkun neċessarju aġent xieraq għas-solubilizazzjoni meta diffiċilment tinħall is-sustanza sperimentali. Dan l-aġent għas-solubilizazzjoni: (a) irid ikun jitħallat ma l-ilma bħal methanol jew acetonitrile; (b) il-konċentrazzjoni tiegħu ma tridx taqbeż 1 % tal-volum totali tas-soluzzjoni maħżuna u trid tikkostitwixxi anqas minn dan fis-soluzzjoni tas-sustanza sperimentali li tiġi f'kuntatt mal-ħamrija (preferibilment anqas minn 0,1 %); u (ċ) m'għandux ikun surfactant jew jagħti lok għal reazzjonijiet solvolitiċi mas-sustanza kimika sperimentali. L-użu ta' aġent solubilizzani għandu jiġi msemmi u ġustifikat fir-rapurtaġġ tad-data.

Alternattiva oħra għal sustanzi li jinħallu bil-mod tikkonsisti fiż-żieda intenzjonali tas-sustanza sperimentali mas-sistema sperimentali: is-sustanza sperimentali tiġi maħlula ġo solvent organiku, u minn dan alikwota tiġi miżjuda mas-sistema tal-ħamrija u 0,01 M soluzzjoni ta' $CaCl_2$ f'ilma distillat jew deionizzat. Il-kontenut tas-solvent organiku fil-fażi bl-ilma għandha tinżamm l-aktar baxxa possibbli, normalment li ma taqbiżx 0,1 %. Iż-żieda intenzjonali ta' soluzzjoni organika tista' tikkomprometti r-riproduċibilità mill-aspett tal-volum. Għaldaqstant, żball addizzjonali jista' jiġi introdott bħala s-sustanza sperimentali u konċentrazzjoni tal-kosolvent ma jkunx l-istess fil-provi kollha.

▼B

1.8. PREREQUIŻITI GĦALL-EŻEKUZZJONI TAL-PROVA TA' L-ADSORBIMENT/DESORBIMENT

1.8.1. **Metodu analitiku**

Fost il-paramentri ewlenin li jistgħu jinfluwenzaw l-akkuratezza tal-miżuri tas-sorbiment hemm il-preċiżjoni tal-metodu analitiku fl-analiżi kemm tal-faži soluzzjoni, kif ukoll tal-faži ta' l-adsorbiment, l-istabilità u l-purezza tas-sustanza sperimentali, il-kisba ta' l-ekwilibriju tas-sorbiment, l-ordni tal-kobor tal-varjazzjonijiet ta' konċentrazzjoni tas-soluzzjoni, ir-rapport ħamrija/soluzzjoni u il-varjazzjonijiet fl-istruttura tal-ħamrija matul il-proċess ta' ekwilibrazzjoni (35) (59-62). Xi eżempji, fokalizzati fuq il-preċiżjoni, jinstgħabu fl-Anness 2.

L-attendibilità tal-metodu analitiku li jintuża trid tiġi kontrollata fir-range ta' konċentrazzjoni li x'aktarx iseħħ matul il-prova. Min jagħmel l-esperiment għandu jħossu ħieles li jiżviluppa metodu xieraq b'akkuratezza, preċiżjoni, riproduċibilità, limiti ta' rivelazzjoni u ġbir xierq. Gwida għall-eżekuzzjoni tal-prova hija mogħtija fl-esperiment li ġej.

Volum xieraq ta' 0,01 M $CaCl_2$, e.ż. 100 $ċm_3$, jitħawwad għal 4 s bil-piż ta' ħamrija, e.ż. 20 g, li għandha adsorbiment għoli, i.e. b'kontenut għoli ta' karbonju organiku u ta' tafal; dawn il-piżijiet u volumi jistgħu ivarjaw skond bżonnijiet analitiċi, imma rapport ħamrija/soluzzjoni ta' 1:5 jista' jirrappreżenta punt ta' bidu konvenjenti. It-taħlita tiġi ċentrifugata u l-faži bl-ilma tista' tiġi filtrata. Ma' din ta' l-aħħar jiġi miżjud volum determinat ta' soluzzjoni maħżuna tas-sustanza sperimentali sabiex kiseb konċentrazzjoni nominali fil-kamp tar-range ta' konċentrazzjoni li x'aktarx iseħħ matul il-prova. Dan il-volum m'għandux jaqbeż 10 % tal-volum finali tal-faži bl-ilma, sabiex in-natura tas-soluzzjoni ta' preekwilibrazzjoni tinbidel mill-anqas possibbli. Is-soluzzjoni tiġi analizzata.

Sabiex jitqiesu s-sustanzi artifiċjali użati fil-mod analitiku u l-effetti martiċi kkawżati mill-ħamrija irid jiġi inkluż "blank run" li jikkonsisti f'sistema ta' ħamrija + soluzzjoni ta' CaCl2 (mingħajr iż-żieda tas-sustanza sperimentali).

Għall-miżuri ta' sorbiment jistgħu jintużaw metodi analitiċi, fosthom kromatografija gass-likwidu (GLC), kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja (HPLC), spettrometrija (e.ż. GC/spettrometrija tal-massa, HPLC/spettrometrija tal-massa) u kont tax-xintillazzjonijiet likwidi (għall-sustanzi radjumarkati). Indipendentement mill-metodu analitiku użat, huwa meqjus adegwat jekk il-ġbir ikun bejn 90 % u 110 % tal-valur nominali. Sabiex titħalla l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni wara li ssir r-ripartizzjoni, il-limiti tar-rivelazzjoni tal-metodu analitiku trid tkun ta' l-anqas żewġ ordinjiet ta' kobor anqas mill-konċentrazzjoni nominali.

Il-karatteristiċi u limiti ta' rivelazzjoni tal-metodu analitiku utilizzat biex isiru l-istudji fuq l-adsorbiment huma importanti biex jiġu definiti il-kondizzjonijiet sperimentali u l-eżekuzzjoni sħiħa tal-prova. Dan il-metodu jsegwi skema sperimentali ġenerali u jipprovdi rakkomandazzjonijiet u linji gwida għal soluzzjonijiet alternattivi fejn il-metodu analitiku u l-faċilitajiet tal-laboratorju jimponi limitazzjonijiet.

▼B

1.8.2. **Għażla tar-rapporti ottimali ħamrija/soluzzjoni**

Fl-istudji tal-fenomeni fuq is-sorbiment, l-għażla tar-rapporti ħamrija/soluzzjoni tiddependi mill-koeffiċjent tad-distribuzzjoni K_d u mill-grad relattiv ta' adsorbiment mixtieq. Il-varjazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjoni tiddetermina l-preċiżjoni statistika tal-miżura li tiddependi mill-forma ta' l-ekwazzjoni ta' l-adsorbiment u, fil-każ ta' l-iskoperta tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimikafis-soluzzjoni, tal-limitazzjoni tal-metodoloġija analitika applikata. Għaldaqstant, fil-prattika ġenerali, ikun utli li jiġu adottati numru limitat ta' rapporti fissi, fejn il-perċentwali ta' adsorbiment tkun aktar minn 20 %, u preferibbilment > 50 % (62), fl-istess ħin kura trid tingħata sabiex il-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fil-fażi bl-ilma tkun dejjem għolja biżżejjed li tiġi mkejla bi preċiżjoni. Dan huwa partikolarment importanti meta il-perċentwali ta' adsorbiment ikunu għolja.

Approċċ konvenjenti biex jintgħażlu r-rapporti ħamrija/ilma xierqa, jibbaża fuq stima tal-valur K_d permezz ta' studji preliminarji jew permezz ta' metodi ta' teknika ta' valutazzjoni stabbiliti (Anness 3). Ir-rapport xieraq jista' mbagħad jintgħażel fuq il-bażi ta' grafika tar-rapport ħamrija/soluzzjoni versus Kd għal persentaġġi fissi ta' adsorbiment (Fig. 1). Tali grafika hija bbażata fuq il-preżuppost li l-ekwazzjoni ta' l-assorbiment hija lineari ([1]). Ir-ralazzjoni applikabbli tinkiseb billi titranġa l-ekwazzjoni (4) tal-K_d fil-forma ta' ekwazzjoni

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

jew fil-forma logaritmika tagħha, billi tassumi li $R = m_{soil}/V0$ and $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$

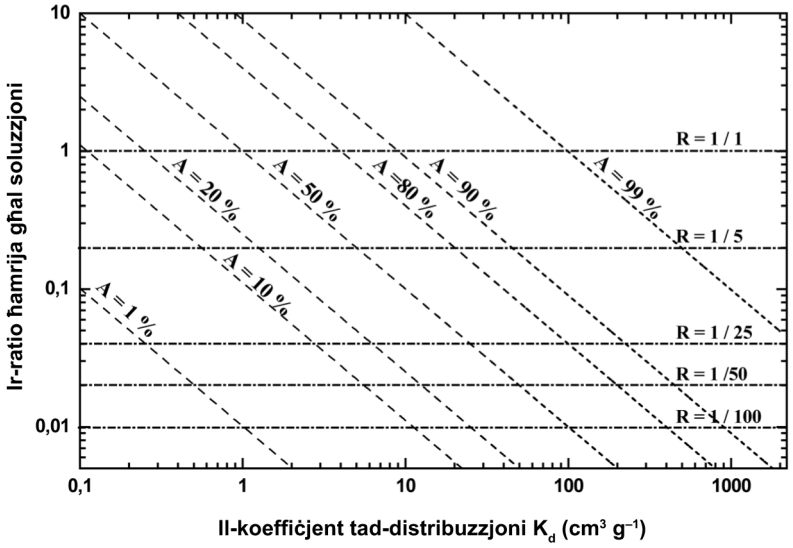


Fig. 1. Relazzjoni bejn il-valur ta' K_d u r-rapporti varji ħamrija/soluzzjoni fil-perċentwali varji tas-sustanza sperimentali adsorbita

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Fig. 1 turi rapporti ħamrija/soluzzjoni meħtieġa bħalha funzjoni K_d għal-livelli differenti ta' adsorbiment. Pe reżempju, għal rapport ħamrija/soluzzjoni ta' 1:5 u K_d ta' 20, l-adsorbiment għandu jkun ta' madwar 80 %. Biex jinkiseb 50 % adsorbiment għall-istess ammont ta' K_d, irid jintuża rapport ta' 1:25. Dan l-approċċ, biex jintagħżlu rapporti xierqa ħamrija/soluzzjoni, joffri lill-investigatur il-flessibilità neċessarja biex ilaħħaq ma' l-eżiġenzi sperimentali.

L-akbar diffikultajiet huma dawk fejn is-sustanza kimika tiġi adsorbita b'doża għolja ħafna jew baxxa ħafna. Meta jkun hemm adsorbiment baxx, hu rakkomandabbli l-użu ta' rapport ħamrija/-soluzzjoni ta' 1:1, għalkemm għal xi tipi ta' ħamrija ta' kontenut organiku għoli jistgħu jkunu neċessarji miżuri iżar sabiex tinkiseb taħlita likwida. Fil-metodoloġija analitika kura trid tingħata biex jitkejjlu bidliet żgħar fil-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni; inkella l-kejl ta' l-adsorbiment ma jkunx preċiż. Minn naħa l-oħra, għal valuri għolja ħafna ta' Kd, tista' tasal għal rapporti ħamrija/soluzzjoni ta' 1:100 biex tħalli fis-soluzzjoni kwantità sinifikattiva ta' sustanza kimika. Madankollu, kura trid tingħata sabiex taħlit sew jiġi żgurat, ħin adegwat irid jitħalla biex is-sistema tilħaq ekwilibriju. Biex issolvi dawn il-każijiet estremi meta metodoloġija analitika tkun nieqsa, possibiltà oħra hija dik li tipprevedi l-valur ta' K_d bl-użu ta' tekniċi ta' valutazzjoni bbażati, pereżempju, fuq valuri P_{ow} (Anness 3). Dan jista' jkun utli speċjalment għal sustanzi kimiċi li għandhom adsorbiment baxx/polari b' $P_{ow} < 20$ u għal dawk lipofili/-altament sorbitivi b' $P_{ow} > 10^4$.

1.9. EŻEKUZZJONI TAL-PROVA

1.9.1. **Il-kondizzjonijiet tal-prova**

L-esperimenti kollha iridu jsiru f'temperatura ambjentali u, jekk possibbli, f'temperatura kostanti bejn 20 °C u 25 °C.

Il-kondizzjonijiet għaċ-centrifugazzjoni iridu jippermettu t-tneħħija ta' partiċelli akbar minn 0,2 μm mis-soluzzjoni. Dan il-valur huwa l-iżar partiċella li hija kkunsidrata partiċella solida, u jirrapreżenta l-limitu bejn partiċelli solidi u kolloidali. Gwida biex jiġu stabbiliti l-kondizzjonijiet taċ-ċentrifugazzjoni hija mogħtija fl-Anness 4.

Jekk il-faċilitajiet taċ-ċentrifugazzjoni ma jkunux jistgħu jiggarantixxu t-tneħħija ta' partiċelli akbar minn 0,2 μm, kombinazzjoni ta' ċentrifugazzjoni u filtrazzjoni b'filtri 0,2 μm tista' tintuża. Dawn il-filtri għandhom ikunu magħmula minn materjal inert xieraq biex jinevita telf tas-sustanza sperimentali fuqhom. F'kull każ, għandu jiġi ppruvat li ma jkun hemm l-ebda telf tas-sustanza sperimentali matul il-filtrazzjoni.

1.9.2. **Stadju 1 – Studju preliminarju**

L-iskop ta' studju preliminarju diġà ngħata fis-sezzjoni Skop. Gwida biex issir tali prova hija mogħtija fl-esperiment suġġerit hawn taħt.

1.9.2.1. *Selezzjoni tar-rapporti ottimali ħamrija/soluzzjoni*

Jintużaw żewġ tipi ta' ħamrija u tlett rapporti ħamrija/soluzzjoni (sitt esperimenti). Tip ta' ħamrija għandha kontenut għoli ta' karbonju organiku u kontenut baxx ta' tafal, u l-oħra għandha kontenut baxx ta' karbonju organiku u kontenut għoli ta' tafal. Ir-rapporti ħamrija/-soluzzjoni huma suġġeriti:

— 50 g ħamrija u 50 $ċm^3$ soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/1),

▼B

— 10 g ħamrija 50 ċm^3 soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/5),

— 2 g ħamrija u 50 ċm^3 soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/25).

L-ammont minimu ta' ħamrija li għandha tintuża tiddependi mill-faċilitajiet tal-laboratorju u l-eżekuzzjoni tal-metodi analitiċi użati. Madankollu, biex jinkisbu riżultati affidabbli mill-prova, hu rakkomandat illi tintuża mill-anqas 1 g, u preferibbilment 2 g.

Sabiex tiġi verifikata l-istabbilità tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni ta' $CaCl_2$ u l-adsorbiment eventwali fuq il-ħitan tal-kontenituri, irid jitlesta' kampjun ta' riferiment li ma jkunx fih ħamrija imma jkun fih biss is-sustanza sperimentali f'soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$ li jiġi sottopost eżattament għall-istess passi tas-sistemi sperimentali.

Għal kull ħamrija jiġi preparat "blank run" bl-istess ammont ta' ħamrija u volum totali ta' soluzzjoni 50 ċm^3 0,01 M $CaCl_2$ (mingħajr prova sperimentali) li tiġi sottoposta għall-istess proċedura sperimentali. Dan iservi bħala kontroll bażiku matul l-analiżi biex jiġu skoperti sustanzi li jinterfeixxu jew ħamrija kontaminata.

L-esperimenti kollha, inklużi kontrolli u "blanks", għandhom isiru minn l-anqas darbtejn. In-numru totali ta' kampjuni li għandhom jitlestew għall-istudju għandhom jiġu kalkolati skond il-metodoloġija li tiġi segwita.

Metodi għall-istudju preliminarju u l-istudju ewlieni huma ġeneralment l-istess, eċċezzjonijiet imsemmija fejn rilevanti.

Il-kampjuni tal-ħamrija mnixxfin bl-arja jiġu ekwilibrati billi jitħawdu għal (12 s) lejl sħih qabel jum l-eaperiment, b'volum minimu ta' 45 ċm^3 ta' 0,01 M $CaCl_2$. Wara jiżdied ċertu volum tas-soluzzjoni riżerva tas-sustanza sperimentali sa total ta' 50 ċm^3. Il-volum tas-soluzzjoni riżerva miżjud: (a) m'għandux ikun aktar minn 10 % tal-volum finali 50 ċm^3 tal-fażi bl-ilma sabiex issir l-anqas bidla possibbli lin-natura tas-soluzzjoni pre-ekwilibrata; u (b) għandu jirriżulta, preferibilment, f'konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija (C_0) akbar b'żewġ ordnijiet ta' preferenza mill-anqas, ta' l-iskoperta tal-metodu analitiku, sabiex tiġi salvagwardjata l-kapaċità biex isiru mizuri eżatti ankè meta l-adsorbiment ikun qawwi (> 90 %) u biex wara jiġu stabbiliti l-iżotermi ta' l-adsorbiment. Hu rakkomandat ukoll, jekk possibbli, illi l-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza (C_0) ma taqbiżx in-nofs tal-limitu tas-solubilità tagħha.

L-eżempju li jmiss juri l-mod kif tikkalkula l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni riżerva (C_{st}). Tibda bil-ħsieb illi l-limitu ta' rivelazzjoni huwa 0,01 μg ċm^{-3} u l-adsorbiment huwa ta' 90 %; għaldaqstant, il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija trid tkun, preferibbilment, 1 μg ċm^{-3} (żewġ ordnijiet ta' kobor għola mil-limitu ta' rivelazzjoni). Jekk jiżdied il-massimu rakkiomandat tal-volum tas-soluzzjoni maħżuna, i.e. 5 sa 45 ċm^3 tas-soluzzjoni ta' ekwilibrazzjoni ta' $CaCl_2$ 0,01 M (= 10 % tas-soluzzjoni maħżuna għal volum totali ta' 50 ċm^3 tal-fażi bl-ilma), il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna għandha tkun ta' 10 μg ċm^{-3}; jiġifieri ogħla bi tliet ordnijiet ta' kobor mil-limitu ta' rivelazzjoni tal-metodu analitiku.

Il-pH tal-fażi bl-ilma għandu jitkejjel qabel u wara kuntatt mal-ħamrija peress li għandu rwol importanti fil-proċess kollu ta' l-adsorbiment, speċjalment għal sustanzi ionizzabbli.

▼B

It-taħlita titħawwad CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment. Il-ħin ta' l-ewilibriju fil-ħamrija huwa varjabbli ħafna, skond is-sustanza kimika fil-ħamrija; perjodu ta' 24 s huwa biżżejjed normalment (77). Fl-istudju preliminari, kampjuni jistgħu jinġabru b'sekwenza matul perjodu ta' taħlit ta' 48 s (pereżempju f'4, 8, 24, 48 s). Madankollu, il-ħinijiet ta' l-analiżi iridu jiġu meqjusa bi flessibilità skond l-iskeda ta' xogħol tal-laboratorju.

Hemm żewġ alternattivi għall-analiżi tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni bl-ilma: (a) il-metodu paralleli (b) il-metodu f'serje. għandu jingħad illi, għalkemm il-metodu paralleli huwa aktar tedjanti fil-kamp sperimentali, it-trattament matematiku tas-soluzzjonijiet huwa aktar sempliċi (Anness 5). Madankollu, l-għażla tal-metodoloġija li għandha tintuża, hija f'idejn il-persuna li tagħmel l-esperiment li tkun trid tqis il-faċilitajiet tal-laboratorju u r-riżorsi li huma disponibbli.

(a) Metodu paralleli: kampjuni bl-istess relazzjoni ħamrija/soluzzjoni humw ppreparati, bl-istess numru ta' intervalli ta' ħin li hu mixtieq biex isir l-istudju tal-kinetika ta' l- adsorbiment. Wara ċentrifugazzjoni u, jekk mixtieq, filtrazzjoni, il-fażi bl-ilma ta' l-ewwel pipetta tiġi miġbura bl-aktar mod komplet possibbli u titkejjel wara, pereżempju, 4 s, dik tat-tieni pipettta wara 8 s, dik tat-tielet wara 24, eċċ.

(b) Metodu f'serje: għal kull rapport ħamrija/soluzzjoni jiġi preparat biss kampjun kampjun doppju wieħed. f'intervalli determinati ta' ħin it-taħlita tiġi ċentrifugata biex il- fażijiet jiġu separati. Alikwota żgħira ta' riżorsi tiġi immedjatament analizzata għas-sustanza sperimentali; imbagħad l-esperiment ikompli bit-taħlita oriġinali. Jekk l- filtrazzjoni tiġi applikata wara ċ-ċentrifugazzjoni, il-laboratorju għandu jkollu faċilitajiet biex issir l-filtrazzjoni ta' aliquoti bl-ilma żgħar. Huwa rakkomandabbli li l-volum totali ta' laliquoti meħuda, ma jkunx aktar mjinn 1 % tal-volum totali tas-soluzzjoni, sabiex ir- rapport ħamrija/-soluzzjoni ma jinbidilx b'mod sinifikattiv u biex titnaqqas il-massa tas- solute disponibbli għall-adsorbiment matul il-prova.

Il-perċentwali ta' l-adsorbiment A_{t_i} huwa kkalkolat f'kull punt ta' ħin (t_i) fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni inizjali nominali u l-konċentrazzjoni mkejla fil-ħin tal-kampjunaġġ (ti), korrett għall-ħin tal-"blank". Plots ta' l- A_{t_i} versus l-ħin (Fig. 1 Anness 5) huma magħmula sabiex jiġi vvalutat jekk inkisbitx il-pjattaforma ta' l-ekwilibriju ([1]). Il-valur K_d fl-ekwilibriju jiġi kkalkolat ukoll. Ibbażat fuq dan il-valur K_d, u bl-użu tal-Fig.1 jintagħżlu rapporti xierqa ħamrija/soluzzjoni, sabiex il-perċentwali ta' l-adsorbiment taqbeż 20 % u preferibbilment > 50 % (61). L-ekwazzjonijiet u l-prinċipji tal-plotting kollha applikabbli huma mgħotija fit-taqsima fuq id-Data u rapurtaġġ u fl-Anness 5.

1.9.2.2. *Determinazzjoni tal-ħin ta' ekwilibrazzjoni ta' l-adsorbiment u ta' l-ammont sustanza sperimentali adsorbita fl-ekwilibriju*

Kif digà msemmi, plots ta' A_{t_i} jew C_{aq}^{ads} versus il-ħin jippermettu stima tat-twettieq ta' l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment u l-ammont ta' sustanza sperimentali adsorbita fl-ekwilibriju. Il-figuri 1 u 2 fl-Anness 5 juru eżempji ta' tali plots. Il-ħin ta' l-ekwilibriju huwa dak neċessarju biex is-sistema tilħaq pjattaforma.

([1]) *Plots* tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test fil-fażi akwea C_{aq}^{ads} versus il-ħin jistgħu jintużaw ukoll għall-kalkolu tal-kisba tal-*plateau* ta' l-ekwilibriju (ara Fig. 2 fl-Anness 5).

▼B

Jekk, b'ħamrija partikolari, ma tintlaħaqx pjattaforma iżda issir żieda kontinwa, din tista' tkun dovuta għal fatturi ta' komplikazzjoni bħal biodegredazzjoni jew diffużjoni bil-mod. Biodegradazzjoni tista' tintwera' billi jirrepeta l-isperiment b'kampjun sterilizzat tal-ħamrija. Jekk anke f'dan il-każ ma tintlaħaq l-ebda pjattaforma, min qed jagħmel l-esperiment għandu jfittex fenomeni oħra li jistgħu ikunu involuti fl-istudji speċifiċi tiegħu; dan jista' jsir b'modifikazzjonijiet xierqa tal-kondizzjonijiet ta' l-esperiment (temperatura, ħin tat-taħwid, rapporti ħamrija/soluzzjoni). Ukoll, min qed jagħmel l-esperiment irid jiddeċidi jekk ikomplix il-proċedura sperimentali malgrad ta' eventwali possibilità li jintlaħaq ekwilibriju.

1.9.2.3. *L-adsorbiment fil-wiċċ tal-kontenituri u l-istabilità tas-sustanza sperimentali*

Xi informazzjoni fuq l-istabliltà tas-sustanza sperimentali u l-adsorbiment tagħha fil-wiċċ tal-kontenituri tagħha tista' tinkiseb billi ssir analiżi tal-kampjuni tal-kontroll. Jekk tiġi osservata deplezzjoni akbar minn l-iżball standard tal-metodu analitiku, tista' tkun kaużata minn degredazzjoni abiotika u/jew adsorbiment fil-wiċċ tal-kontenitur sperimentali. Distinzjoni bejn dawn iż-żewġ fenomeni tista' tintlaħaq billi jinħaslu sew il-ħitan tal-kontenitur b'volum magħruf ta' solvent xieraq u billi jiġi analizzat il-likwidu tal-ħasil għas-sustanza sperimentali. Jekk l-ebda adsorbiment ma jinstab fil-wiċċ tal-kontenituri sperimentali, il-fasda turi instabilità abiotika tas-sustanza sperimentali. Jekk jinstab adsorbiment, bdil tal-materjal tal-kontenituri sperimentali ikun neċessarju. Madankollu, data fuq l-adsorbiment tal-wiċċ tal-kontenituri sperimentali miġbura minn dan l-esperiment ma tistax tiġi estrapolata direttament lill-esperiment ħamrija/soluzzjoni. Il-preżenza ta' ħamrija taffetwa l-adsorbiment.

Informazzjoni addizzjonali fuq l-istabilità tas-sustanza sperimentali tista' tinkiseb billi jiġi stabbilit bilanċ tal-massa proġenitriċi fiż-żmien. Dan ifisser illi l-fażi bl-ilma, estratti ta' ħamrija u ħitan ta' kontenituri sperimentali jiġu analizzati għas-sustanza sperimentali. Id-differenza bejn il-massa ta' kimika sperimentali miżjuda u s-somma tal-massi kimiċi sperimentali fil-fażi bl-ilma, fl-estratti tal-ħamrija u fil-ħitan ta' kontenituri sperimentali huwa ugwali għal massa degredata u/jew volatilizzata u/jew mhux estratta. Sabiex issir determinazzjoni tal-bilanċ tal-massa, l-ekwilibriju ta' adsorbiment trid tintlaħaq matul l-perjodu ta' l-esperiment.

Il-bilanċ tal-massa jrid isir kemm fuq ħamrija kif ukoll fuq rapport ħamrija/soluzzjoni għal kull tip ta' ħamrija li fl-ekwilibriju tagħti lok għal fasda għola minn 20 % u preferibbilment > 50 %. Meta l-esperiment għar-riċerka tar-rapporti jintemm bl-analiżi ta' l-aħħar kampjun tal-ħaži bl-ilma wara 48 s, il-fażijiet iridu jiġu separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u, jekk mixtieqa, filtrazzjoni. Il-fażi bl-ilma trid tinġabar fl-akbar kwantità possibbli, biż-żieda ta' solvent ta' estrazzjoni adatt (koeffiċjent ta' estradizzjoni mhux anqas minn 95 %) mal-ħamrija biex tiġi estratta s-sustanza sperimentali. Minn l-anqas żewġ estrazzjonijiet suċċessivi huma rakkomandati. L-ammont ta' sustanza sperimentali estratt mill-ħamrija u mill-kontenitur jiġi determinat u l-bilanċ tal-massa jiġi kkalkolat (ekwazzjoni 10, data u rapurtaġġ). Jekk ikun anqas minn 90 %, is-sustanza sperimentali hija meqjusa instabbli fil-perjodu ta' ħin ta' l-esperiment. Madankollu, studji xorta jistgħu jitkomplew, għalkemm l-instabilità tas-sustanza sperimentali trid tiġi meqjusa; f'dan il-każ huwa rakkomandat biex jiġu analizzati ż-żewġ fażijiet fl-istudju prinċipali.

▼B

1.9.2.4 *Stadju 2 – Kinetika ta' l-adsorbiment għal konċentrazzjoni ta' sustanza sperimentali*

Jintużaw ħames kwalitajiet ta' ħamrija, selezzjonati minn Tabella 1. Jekk dan ikun xieraq, huwa vantaġġuż jekk tintuża kull kwalità ta' ħamrija użata fl-istudju preliminari fost dawn il-ħames kwalitajiet ta' ħamrija. F'dan il-każ, Stadju 2 m'għandux jerġa' jiġi repetut għall-kwalitajiet ta' ħamrija użati fl-istudju preliminarju.

Il-ħin ta' l-ekwilibriju, ir-rapport ħamrija/soluzzjoni, il-piż tal-kampjun tal-ħamrija, il-volum tal-fażi bl-ilma f'kuntatt mal-ħamrija u il-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni huma magħżula fuq il-bażi tar-riżultati ta' l-istudji preliminarji. L-analiżi trid issir, bejn wieħed u ieħor, 2, 4, 6, 8 (possibliment ankè 10) u 24 s wara l-ħin tal-kuntatt; il-ħin tat-taħwid jista' jiġi estiż sa massimu ta' 48 s fil-każ illi sustanza kimika tirrikjedi ħin itwal biex jintlaħaq l-ekwilibriju fil-każ tar-riżultati tar-riċerka fil-qasam tar-rapporti. Madankollu, il-ħinijiet ta' l-analiżi jridu jiġu kkunsidrati b'flessibilità.

Kull esperiment (ħamrija waħda u soluzzjoni waħda) isir doppju mill-inqas biex tkun tista' tiġi vvalutata l-varjanza fir-riżultati. F'kull esperiment isir wieħed "blank". Dan jikkonsisti fil-ħamrija u fis-soluzzjoni ta' $CaCl_2$ 0,01 M, mingħajr iż-żieda ta' sustanza sperimentali, ta' piż u volum, rispettivament, identiku għal dak ta' l-esperiment. Sabiex ikun hemm salvagwardja għall-imprevvist, kampjun ta' kontroll bis-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni ta' $CaCl_2$ 0,01 M biss (mingħajr ħamrija) jiġi soġġett għall-istess proċedura sperimentali.

Il-persentaġġ ta' adsorbiment jiġi kkalkolat f'kull punt ta' ħin A_{t_i} u/jew intervall ta' ħin $A_{\Delta t_i}$ (skond il-bżonn) impinġi kontra l-ħin. Jiġu ukoll ikkalkolati l-koeffiċjent ta' distribuzzjoni K_d at equilibrium, u l-koeffiċjent ta' adsorbiment normalizzat tal-karbonju organiku K_{oc} (għall-komposti kimiċi organiċi mhux polari).

Riżultati tal-provi fuq il-kinetika ta' l-adsorbiment

Il-valur linjari K_d hu ġeneralment preċiż biżżejjed biex tkun jista' tiġi deskritta l-imġieba relattiva għas-sorbiment fil-ħamrija (35) (78) u jirrapreżenta espressjoni tal-mobilità intrinsika tal-prodotti kimiċi fil-ħamrija. Pereżempju, ġeneralment, kimiċi b' $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} huma meqjusa kwalititivament mobbli. Simili hija l-iskema ta' klassifikazzjoni tal-mobilità bbażata fuq valuri K_{oc} żviluppata minn MacCall *et al*. (16). Addizzjonalment, jeżistu skemi ta' klassifikazzjoni ta' filtrazzjoni li huma bbażati fuq ir-relażżjoni bejn K_{oc} u DT-50 ([1]) (32) (79).

Ukoll, skond studji fuq l-analiżi ta' l-iżbalji (61), valuri K_d anqas minn 0,03 cm^3 g^{-1} ma jistgħux jiġu vvalutati akkuratament minn tnaqqis fil-konċentrazzjoni fil-fażi bl-ilma, ankè meta jintuża l-aktar rapport ħamrija/soluzzjoni favorevoli (mil-lat tal-preċiżjoni), i.e. 1:1. F'dan il-każ l-analiżi taż-żewġ fażijiet, ħamrija u soluzzjoni, hija rakkomandata.

([1]) DT-50: il-ħin tad-degradazzjoni għal 50 % tas-sustanza għat-test.

▼B

Rigward l-osservazzjonijiet magħmula 'l fuq, huwa rakkomandat illi jitkompla l-istudju ta' l-imġieba ta' l-adsorbiment ta' prodott kimiku fil-ħamrija u l-mobilità potenzali tiegħu billi jiġu stabbiliti l-iżotermi ta' adsorbiment skond Freundlich għal dawn is-sistemi, għal liema, id-determinazzjoni ta' K_d hija possibbli bil-protokoll sperimentali segwit f'dan il-metodu sperimentali. Determinazzjoni akkurata tkun possibbli jekk il-valur li jirriżulta billi ssir multiplikazzjoni tal- K_d mar-relazzjoni ħamrija/soluzzjoni ikun > 0,3, meta l-miżuri jkunu bbażati fuq tnaqqis fil-konċentrazzjoni fil-fażi bl-ilma (metodu indirett), jew > 0,1, meta ż-żewġ fażijiet jiġu analizzati (metodu dirett) (61).

1.9.2.5. *Stadju 3 – Iżotermi ta' adsorbiment u kinetika ta' desorbiment/-iżotermi ta' desorbiment*

1.9.2.5.1. Iżotermi ta' adsorbiment

Jintużaw ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza, li jkopru żewġ ordnijiet ta' kobor; fl-għażla ta' dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu meqjusa s-solubilità fl-ilma u l-konċentrazzjoni fl-ekwilibriju bl-ilma li jirriżulta. L-istess relazzjoni ħamrija/soluzzjoni għal kull kwalità ta' ħamrija għandha tinżamm għat-tul kollu ta' l-istudju. Il-prova ta' l-adsorbiment hija magħmula kif deskritt 'il fuq, bl-uniku differenza illi l-fażi bl-ilma tiġi analizzata darba biss fil-ħin neċessarju biex jintlaħaq l-ekwilibriju kif determinat qabel fl-Istadju 2. Il-konċentrazzjonijiet ta' l-ekwilibriju fis-soluzzjoni jiġu determinati u l-ammont adsorbit jiġi kkalkolat mill-fasda tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni jew bil-metodu indirett. Il-massa adsorbita għall-unità tal-massa tal-ħamrija tiġi mpinġija grafikament bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni fl-ekwilibriju tas-sustanza sperimentali (ara Data u rapurtaġġ).

Riżultati ta' l-esperiment għall-iżotermi ta' l-adsorbiment

Fost il-mudelli matematiċi ta' l-adsorbiment proposti s'issa, l-iżoterma Freundlich hija dik li tintuża l-iktar biex tiddeskrivi l-proċess ta' l-adsorbiment. Informazzjoni aktar dettaljata fuq l-interpretazzjoni u l-importanza tal-mudelli ta' l-adsorbiment hija prevista fir-referenzi (41) (45) (80) (81) (82).

Nota: Għandu jiġi osserva illi, għal sustanzi varji, konfront bejn il-valuri ta' K_F (koeffiċjent ta' l-adsorbiment ta' Freundlich) hu possibbli biss jekk dawn il-valuri K_F huma espressi fl-istess unità (83).

1.9.2.5.2. Kinetika tad-desorbiment

L-għan ta' dan l-esperiment huwa illi jiġi nvestigat jekk sustanza kimika tiġix adsorbita riversibilment jew irriversibilment mill-ħamrija. Din l-informazzjoni hija mportanti, peress illi l-proċess ta' desorbiment għandu ukoll rwol importanti fl-imġieba ta' sustanza kimika f'ħamrija ta' l-għalqa. Madankollu, id-data tad-desorbiment tikkontribwixxi utilment għall-mudellar kompjuterizzat tal-filtrazzjoni u għas-simulazzjoni tas-sustanza li tddewweb. Jekk studju ta' desorbiment ikun mixtieq, huwa rakkomandat li l-istudju rakkomandat hawn taħt isir fuq kull sistema fejn determinazzjoni akkurata ta' K_d fil-esperiment tal-kinetika ta' l-adsorbiment preċedenti tkun possibbli.

B'mod analogu ma' l-istudju tal-kinetika ta' l-adsorbimetnt, biex tiġi studjata l-kinetika tad-desorbiment hemm żewġ metodi: (a) il-metodu paralleli u (b) il-metodu f'serje. L-għażla tal-metodoloġija li għandha tapplika titħalla f'idejn min ikun qed jagħmel l-esperiment li jkun irid jikkonsidra il-faċilitajiet disponibbli u r-riżorsi tal-laboratorju.

▼B

(a) Metodu paralleli: għal kull ħamrija magħżula għall-istudju fuq id-desorbiment, jitlestew kampjuni bl-istess relazzjoni ħamrija/-soluzzjoni, daqs kemm hemm intervalli ta' ħin li fihom tixtieq tiġi studjata l-kinetika tad-desorbiment. Preferibilment, jiġu applikati l-istess intervalli ta' ħin utilizzati għall-kinetika ta' l-adsorbiment; madankollu, il-ħin totali jista' jiġi estiż skond inneċessità sabiex is-sistema tkun tista' tilħaq l-ekwilibriju ta' desorbiment. F'kull esperiment (ħamrija waħda, soluzzjoni waħda) isir wieħed "blank". Dan jikkonsisti fil-ħamrija u fis-soluzzjoni 0,01 M ta' $CaCl_2$, mingħajr is-sustanza sperimentali, u ta' piż u valur, rispettivament, identiku għal dawk ta' l-esperiment. Bħala kampjun ta' kontroll, is-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni 0,01 M ta' $CaCl_2$ (mingħajr ħamrija) hija soġġetta għall-istess proċedura sperimentali. It-taħlit kollu tas-soluzzjoni mal-ħamrija jitħawwad sakemm jintlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (kif determinat qabel fl-Istadju 2). Imbagħad, il-fażijiet jiġu separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u l- fażijiet bl-ilma, kemm ikun possibbli, jitneħħew. Il-volum ta' soluzzjoni mneħħi jiġi sostitwit b'volum ugwali ta' 0,01 M $CaCl_2$ mingħajr is-sustanza sperimentali u t-taħlit il-ġdid jiġi mħawwad mill-ġdid. Il-fażi bl-ilma ta' l-ewwel pipetta tiġi miġbura bl-aktar mod komplet possibbli u tiġi mkejla, pereżempju, wara 2 s, dik tat-tieni pipetta wara 4 s, dik tat-tielet wara 6 s, eċċ. CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment.

(b) Metodu f'serje: wara l-esperiment tal-kinetika ta' l-adsorbiment, it-taħlita tiġi ċentrifugata u l-fażi bl-ilmam, sakemm ikun possibbli, titneħħa. Il-volum tas-soluzzjoni li jitneħħa jiġi sostitwit b'volum ugwali ta' $CaCl_2$ 0,01 M, mingħajr is-sustanza sperimenmtali. It-taħlita l-ġdida tiġi mħawwda CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment. Matul dan il-perjodu ta' żmien, f'intervalli definiti ta' ħin, it-taħlita tiġi ċentrifugata biex jiġu separati l-fażijiet. Alikuota żgħira tal-fażi bl-ilma tiġi immedjatament eżaminata għas-sustanza sperimentali; imbagħad, l-esperiment ikompli bit-taħlita oriġinali. Il-volum ta' kull alikwota individwali għandu jkun inqas minn 1 % tal-volum totali. Tiġi miżjuda mat-taħlita l-istess kwantità ta' soluzzjoni friska ta' $CaCl_2$ 0,01 M biex jinżamm l-istess rapport ħamrija/soluzzjoni, u tkompli tiġi mġawda sa l-intervall ta' ħin li jmiss.

Il-perċentwlai tad-desorbiment jiġi kkalkolatf'kull punt ta' ħin (D_{t_i}) u/jew intervall ta' ħin ($D_{\Delta t_i}$) (skond l-eżiġenzi ta' l-istudju) u tiġi mpinġija grafikament kontra l-ħin. Jiġi kkalkolat ukoll il-koeffiċjent tad-desorbiment Kdes fl-ekwilibriju. L-ekwazzjonijiet applikabbli kollha huma msemmija f'Data u Rapurtaġġ u Anness 5.

Riżultati ta' l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment

Tpinġija grafika kommuni tal-persentaġġ ta' desorbiment D_{t_i} u l-adsorbiment A_{t_i} kontra l-ħinjippermettu stima tar-riversibilità tal-proċess ta' l-adsorbiment. Jekk l-ekwilibriju tad-desorbiment jintlaħaq ankè f'darbtejn il-ħin ta' l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment, u d-desorbiment totali ikun aktar minn 75 % ta' l-ammont adsorbit, l-adsorbiment huwa meqjus irriversibbli.

1.9.2.5.3. Iżotermi tad-desorbiment

L-iżotermi tad-desorbiment skond Freundlich huma determinati fuq ħamrija użata fl-esperiment fuq l-iżotermi ta' l-adsorbiment. Il-prova tad-desorbiment issir kif deskritta fit-taqsima Kinetika tad-desorbiment, bl-unika differenza illi il-fażi bl-ilma tiġi analizzata darba biss, fl-ekwilibriju tad-desorbiment. Jiġi kkalkolat l-ammont ta' sustanza sperimentali desorbit. Il-kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment tiġi mpinġija grafikament bħalha funzjoni tal-konċentrazzjoni ta' l-ekwilibriju tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni (ara Data u rapurtaġġ u Anness 5).

▼B

2. ***DATA* U RAPURTAĠĠ**

Id-*data* analitika tiġi preżentata f'forma ta' tabella (ara Anness 6). Jingħataw il-miżuri u l-medji individwali kalkolati. Jingħataw rappreżentazzjonijiet grafiċi ta' l-iżotermi ta' l-adsorbiment. Il-kalkoli jsiru kif deskritt hawn taħt.

Għall-iskop tal-prova, huwa meqjus illi l-piż ta' 1 cm_3 ta' soluzzjoni bl-ilma huwa 1 g. Ir-rapport ħamrija/soluzzjoni jista' jiġi espress f'unità ta' w/w jew w/vol għall-istess figura.

2.1. ADSORBIMENT

L-adsorbiment A_{t_i}) huwa definit bħala l-persentaġġ tas-sustanza adsorbita fuq il-ħamrija relatata mal-kwantità preżenti fil-bidu tal-prova, taħt il-kondizzjonijiet sperimentali. Jekk is-sustanza sperimentali tkun stabbli u ma t'adsorbix b'mod sinifikattiv mal-ħajt tal-konteniturA_{t_i}, tiġi kkalkolata f'kull punt ta'ħin t_1, skond l-ekwazzjoni:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

meta:

A_{t_i} = presentaġġ ta' adsorbiment fil-punt ta' ħin t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fil-ħin t_i (μg);

m_0 = massa tas-sustanza sperimentali fil-pipetta fil-bidu tal-prova (μg).

Informazzjoni dettaljata fuq kif għandu jiġi kkalkolat il-persentaġġ ta' adsorbiment A_{t_i} għall-metodi paralleli u f'serje hija mogħtija fl-Anness 5.

Il-koeffiċjent ta' distribuzzjoni K_d huwa r-relazzjoni bejn il-kontenut tas-sustanza fil-faži tal-ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fis-soluzzjoni bl-ilma, taħt il-kondizzjonijiet tal-prova meta jintlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

meta:

$C_s^{ads}(eq)$ = kontenut tas-sustanza adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-faži bl-ilma fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg cm^{-3}). Din il-konċentrazzjoni tiġi analitikament determinata billi jitqiesu il-valuri mogħtija mill-"blanks"

$m_s^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg);

m_{soil} = kwantità tal-faži ħamrija, espressa f'massa xotta tal-ħamrija (g);

V_0 = volum inizjali tal-faži bl-ilma f'kuntatt mal-ħamrija (cm^3).

Ir-relazzjoni bejn A_{eq} u K_d hija mogħtija minn:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

meta:

A_{eq} = persentaġġ ta' adsorbiment fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment, %.

Il-koeffiċjent normalizzat ta' l-adsorbiment tal-karbonju organiku K_{oc} jirrelata l-koeffiċjent ta' distribuzzjni Kd mal-kontenut ta' karbonju organiku tal-kampjun tal-ħamrija:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

:meta

%OC = persentaġġ tal-karbonju organiku fil-kampjun tal-ħamrija (g g^{-1}).

Il-koeffiċjent K_{oc} jirrapreżenta valur singolu li jikkaratterizza l-partizzjoni tas-sustanzi kimiċi organiċi li mhumiex polari bejn il-karbonju organiku li jinstab fil-ħamrija jew fis-sediment u l-ilma. L-adsorbiment ta' dawn il-kimiċi huwa korrelatat mal-kontenut organika tas-solidu sorbeni (7); għalhekk, valuri K_{oc} jiddependu fuq karatteristiċi speċifiċi tal-frazzjonijiet umiċi li jvarjaw konsider-evolment fil-kapaċità tas-sorbiment, dovut għad-differenzi fl-oriġini, ġenesi, eċċ.

2.1.1. **Iżotermi ta' l-adsorbiment**

L-ekwazzjoni ta' l-iżotermi ta' adsorbiment ta' Freundlich trirrelata l-ammont tal-prova sperimentali adsorbita mal-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju (ekwazzjoni 8).

Id-*data* tiġi trattata kif deskritt f Adsorbiment' u, għal kull pipetta jiġi kkalkolat il-kontenut tas-sustanza sperimentali adsorbit fuq il-ħamrija wara l-prova ta' l-adsorbiment ($C_s^{ads}(eq)$ banda oħra indikat bħal x/m). Jitlaq bl-idea illi l-ekwilibriju ntlaħaq u illi $C_s^{ads}(eq)$ jirrapreżenta l-valur ta' l-ekwilibriju:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

L-ekwazzjoni ta' l-adsorbiment ta' Freundlich hija murija f (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

jew fil-forma linjari

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

meta:

K_F^{ads} = Freundlich il-koeffiċċjent ta' l-adsorbiment; id-dimensjoni tiegħu huwa ta' ċm^3 g^{-1} biss jekk 1/n = 1; fil-każi l-oħra kollha, is-*slope* 1/n huwa introdott fid-dimensjoni ta' K_F^{ads} 1-1/n 3 1/n - 1 (μg (ċm) g);

n = kostanti tar-regressjoni; 1/n ġeneralment ivarja bejn 0,7 - 1,0, li jindika illi d-data ta' sorbiment frekwentement tvarja ftit mil-linearità.

Ekwazzjonijiet (8) u (9) huma mpinġija grafikament u jiġi kkalkolati l-valuri ta' K_F^{ads} u 1/n permezz ta' analiżi ta' rigressjoni bl-applikazzjoni ta' -ekwazzjoni 9. Jiġi kkalkolat il- koeffiċjent tal-korrelazzjoni r_2 ta' l-ekwazzjoni logartimika is also calculated. Eżempju ta' tali grafika hia mogħtija f'Fig. 2.

▼B

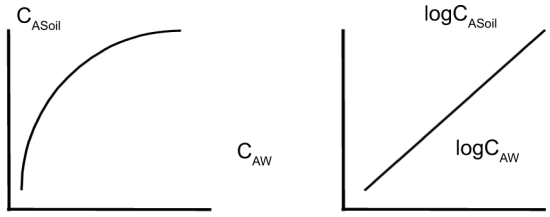


Fig. 2. Grafika ta' adsorbiment skond Freundlich, normali u linearizzata

2.1.2. **Bilanċ tal-massa**

Il-bilanċ tal-massa (MB) huwa definit bħalha l-persentaġġ tas-sustanza li tista' tiġi analitikament miġbura wara prova ta' adsorbiment konta l-ammont nominali tas-sustanza fil-bidu tal-prova.

It-trattament tad-data ma jkunx l-istess jekk is-solvent ikun jista' jitħallat kompletament ma' l-ilma. Fil-każ ta' solvent li jista' jitħallat ma' l-ilma, it-trattament ta' data deskritta taħt "Desorbiment" jista' jiġi applikat biex jiġi stabbilit l-ammont ta' sustanza miġbura mill-estrazzjoni tas-solvent. Jekk is-solvent jitħallat inqas faċilment ma' l-ilma, trid issir determinazzjoni ta' l-ammont miġbur.

Il-bilanċ tal-massa MB għall-adsorbiment jiġi kkalkolat kif ġej; huwa preżunt illi (m_E) jikkorrispondi għas-somma tal-massa tal-prodotti kimiċi estratti mill-ħamrija u mill-wiċċ tal-kontenitur permezz ta' solvent organiku:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \ (\%) \qquad (10)$$

meta:

MB = bilanċ tal-massa(%)

m_E = massa totali tal-prova sperimentali estratta mill-ħamrija u mill-ħitan tal-kontenitur sperimentali f'żewġ stadji (μg);

C_0 = konċentrazzjoni inizjali tal-massa tas-soluzzjoni sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija (μg cm^{-3});

V_{rec} = volum tas-supernatant miġbur wara l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (cm^{-3}).

2.2. DESORBIMENT

Id-desorbiment (D) huwa definit bħala l-persentaġġ tas-sustanza sperimentali li tiġi desorbita, b'referenza għall-kwantità tas-sustanza preċedentement adsorbita, fil- kondizzjonijiet sperimentali:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

meta:

D_{t_i} = persentaġġ ta' desorbiment f'punt ta' ħin t_i(%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija f'punt ta' ħin (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' -adsorbiment (μg).

Informazzjoni dettaljata fuq kif għandu jiġi kkalkolat il-persentaġġ ta' desorbiment D_t għall-metodi paralleli u f'serje hu mgħoti fl-Anness 5.

Il-koeffiċjent tad-desorbiment apparenti (K_{des}), taħt il-kondizzjonijiet sperimentali, huwa r-rapport bejn il-kontenut tas-sustanza li tibqa fil-fażi ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza desorbita fis-soluzzjoni bl-ilma, meta jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

meta:

K_{des} = il-koeffiċjent tad-desorbiments ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa totali tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija fl-ekwilibriju tad- desorbiment (μg)

V_T = volum totali tal-fażi bl-ilma f'kuntatt mal-ħamrija matul il-prova tal-kinetika tad-desorbiment (cm^3).

Gwida biex jiġi kkalkolat $m_{aq}^{des}(eq)$ hija mogħtija fl-Anness 5 taħt l-intestatura "Desorbiment".

Rimarka:

Jekk il-preċedenti prova ta' adsorbiment, issir bil-metodu paralleli, il-volum V_T fl-ekwazzjoni 12 huwa meqjus ugwali għal V_0.

2.2.1. **Iżotermi tad-desorbiment**

L-ekwazzjoni ta' l-iżotermi tad-desorbiment ta' Freundlich jikkollegaw il-kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa adsorbita fuq il-ħamrija mal-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju tad-desorbiment (ekwazzjoni 16).

Għal kull pipetta, il-kontenut tas-sustanza li jibqa adsorbit fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment jiġi kkalkolat kif ġej:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ jiġi definit bħalha:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

fejn:

$C_s^{des}(eq)$ = kontenut tas-sustanza sperimentali li jibqa' adsorbit fuq il-ħamrija fl-s ekwilibriju tad-desorbiment (μg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = il-massa tas-sustanza determinata b'mod analitiku fil-fażi akwea fl-ekwilibriju tad-desorbiment (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = il-massa tas-sustanza għat-test imħolli mill-ekwilibriju minħabba r-rimpjazzar inkomplet tal-volum (μg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = il-massa tas-sustanza fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^F = volum tas-soluzzjoni meħud mill-pipetta għall-kejl tas-sustanza sperimentali (cm^3);

V_R = volum tas-supernatant mneħħi mill-pipetta wara li jkun intlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment u sostitwit bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3);

L-ekwazzjoni ta' desorbiment skond Freundlich hija mogħtija f (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

jew fil-forma lineari

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

meta:

K_F^{des} = koeffiċjent ta' desorbiment skond Freundlich;

n = kostanti ta' rigressjoni;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-faži bl-ilma fl-ekwilibriju tad-desorbiment (ug cm^{-3}).

L-ekwazzjonijiet 16 u 17 jistgħu jitpinġew grafikament u il-valur ta' K_F^{des} u 1/n jiġu kkalkolati bl-analiżi tar-rigressjoni bl-użu ta' l-ekwazzjoni 17.

Rimarka:

Jekk l-esponenti 1/n ta' adsorbiment jew desorbiment, skond Freundlich, huwa ugwali għal 1, il-vinkoli kostanti ta' l-adsorbiment jew tad-desorbiment skond Freundlich (KF u KF) ikunu ugwali, rispettivament, għal kostanti ta' l-ekwilibriju fl-adsorbiment jew fid-desorbiment (K_F^{ads} u K_F^{ads}), u it-tpinġija grafika ta' C_s vs C_{aq} tkun lineari. Jekk l-esponenti ikunu differenti minn 1, it-tpinġija grafika ta' C_s vs C_{aq} ma tkunx lineari u l-kostanti ta' l-adsorbiment u d-desorbiment ivarjaw matul l-iżotermi.

2.2.2. **Rapport tal-prova**

Ir-rapport tal-prova għandu jindika l-informazzjoni li ġejja:

— Identifikazzjoni kompleta tal-kampjuni tal-ħamrija użat inkluż:

— referenza ġeografika tal-lokalità (latitudni, longitudni),

— data meta jittieħed il-kampjun,

▼B

— skema ta' impieg (e.ż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.),

— fond ta' fejn jittieħed il-kampjun,

— kontenut f'ramel/torba/tafal,

— valuri tal-pH (bħal CaCl2 0,01 M),

— kontenut f'karbonju organiku,

— kontenut f'sustanza organika,

— kontenut f'nitroġenu,

— rapport C/N,

— kapaċità ta' skambjar katjoniku (mmol/kg),

— l-informazzjoni kollha dwar il-kollezzjoni u l-ħażna tal-kampjun tal-ħamrija,

— meta approprjat, l-informazzjoni kollha rilevanti għall-interpretazzjoni ta' l-adsorbiment desorbiment tas-sustanza sperimentali,

— referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru,

— informazzjoni fuq is-sustanza sperimentali, kif xieraq,

— temperatura ta' l-esperimenti,

— kondizzjonijiet taċ-ċentrifugazzjoni,

— proċedura analitika użata biex tiġi analizzata s-sustanza sperimentali,

— justifikazzjoni għall-użu ta' kwalsiasi aġent solubilizzanti għattlestija tas-soluzzjoni maħżuna tas-sustanza sperimentali,

— spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet magħmula fil-kalkoli, jekk rilevanti,

— data skond il-formularju (Anness 6) u preżentazzjonijiet grafiċi,

— l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jistgħu ikunu utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati tal-provi.

3. **REFERENZI**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. AND Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/-Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (Koc) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health jew especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R. C., Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M. H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), "Adsorptions-und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), "Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G. G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), "Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19: pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), "Precision in pesticide adsorption measurements". Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106". Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), "Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), "Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité". Revue de l'Agric., 34 (4), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test". Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases". Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), "The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), "Studies in adsorption: XI A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". J. Chem. Soc., pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

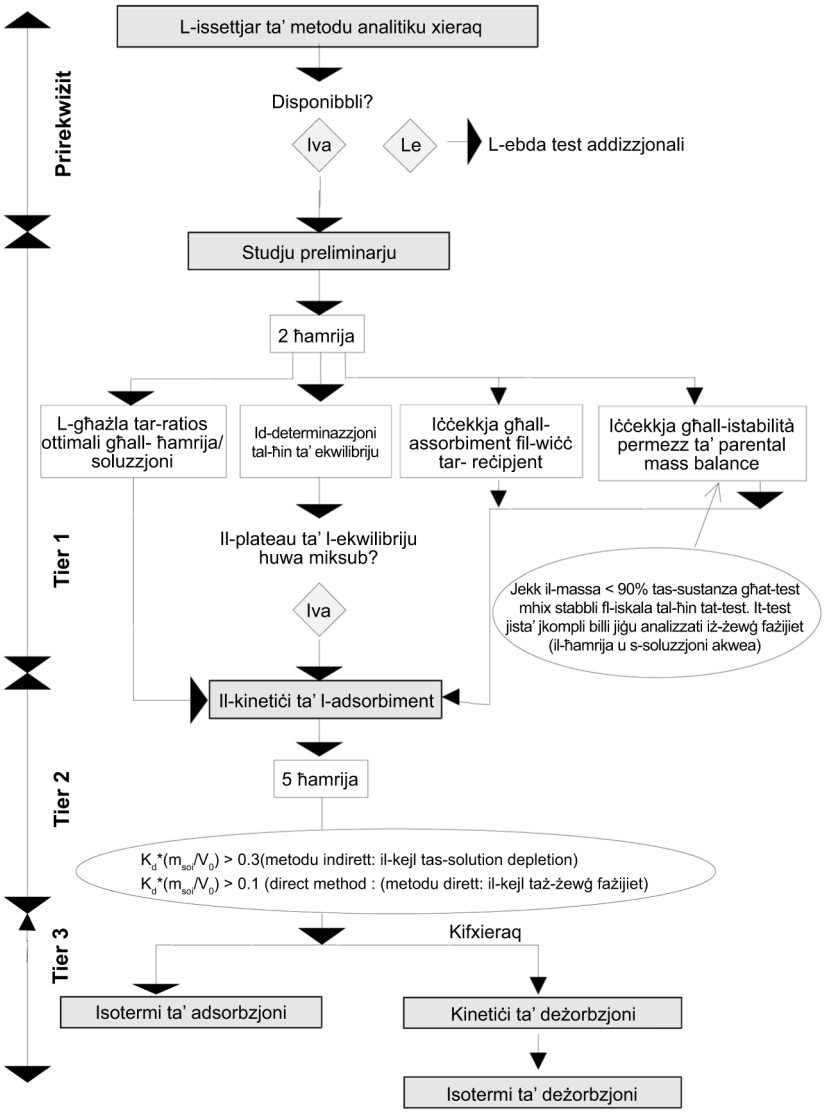
(84) Guth, J. A., (1985), "Adsorption/desorption", in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

ANNESS 1

Skema tal-prova



▼B

ANNESS 2

INFLUENZA TA' PREĊIŻJONI TA' METODU ANALITIKU U BIDLA FIL-KONĊENTRAZZJONI FUQ PREĊIŻJONI TA' RIŻULTATI TA' L-ASSORBIMENT

Mit-tabella li ġejja (84) jidher ċar li meta d-differenza bejn il-massa inizjali (m_0=110 µg) u lads massa ta' l-ekwilibriju (m_{aq}(eq)=100 µg) tas-sustanza għat-test fis-soluzzjoni hi ċkejkna ħafna, żball ta' 5 % fil-kejl tar-riżultati tal-konċentrażżjoni ta' l-ekwilibriju fi żball ta' 50 % fil-kalkolu tal-massa tas-sustanza adsorbita fil-ħamrija (m_s^{ads}(eq)) u ta' 52,4 % fil-kalkolu ta' K_d.

Lammont ta'ħamrija m_{soil} = 10 g

Il-volum tas-soluzzjoni V_0 = 100 cm^3

	m_{aq}^{ads}(eq) (µg)	C_{aq}^{ads}(eq) (µg cm^{-3})	R	m_s^{ads}(eq)∗ (µg)	C_s^{ads}(eq)∗ (µg g^{-1})	R‡	K^{d}∗	R‡
	GĦAL A = 9 %							
m_0 = 110 µg jew C_0 = 1, 100 µg/cm3	100	1,000	true value	10	1,00	true value	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	GĦAL A = 55 %							
m_0 = 110 µg jew C_0 = 1, 100 µg/cm3	50,0	0,500	Valur aawtentik-u	60,0	6,00	Valur awtentiku	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	FOR A = 99 %							
m_0 = 110 µg jew C_0 = 1, 100 µg/cm3	1,100	0,011	true value	108,9	10,89	true value	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}} .\ Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

m_s^{ads}(eq) = il-massa tas-sustanza għat-test fil-fażi tal-ħamrija f'ekwilibriju, µg;

m_{aq}^{ads}(eq) = il-massa tas-sustanza għat-test fil-fażi tal-ħamrija f'ekwilibriju, µg;

C_s^{ads}(eq) = il-kontenut tas-sustanza għat-test fil-fażi tal-ħamrija f'ekwilibriju, µg g^{-1};

C_{aq}^{ads}(eq) = konċentrazzjoni ta' massa tas-sustanza għat-test fil-fażi akwea f'ekwilibriju, µg cm^{-3};

R = żball analitiku fid-determinazzjoni tal- m_{aq}^{ads}(eq);

R‡ = żball kalkkulat minħabba l-iżball analitiku R.

▼B

ANNESS 3

METODI TA' TEKNIKA TA' STIMA GĦAL K_D

1. Tekniki ta' kalkolu jippermettu t-tbassir ta' K_d ibbażata fuq il-korrelazzjoni ma', pre eżempju, P_{ow} valuri (12)(39)(63-68), id-*data* tas-solubilità ta' l-ilma (12)(19)(21)(39)(68-73), jew id-*data* tal-polarità derivata bl-applikazzjoni ta' HPLC fuq il-faži reversed (74-76). Kif jidher fit-Tabelli 1 u 2, huwa K_{oc} jew K_{om} li huma kkalkulati minn dawn l-ekwazzjonijiet imbagħad, indirettament, il-K_d mill-ekwazzjonijiet:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Il-kunċett ta' dawn il-korrelazzjonijiet huwa bbażat fuq żewġ suppożizzjonijiet: (1) hija l-materja organika tal-ħamrija li prinċiparjament tinfluenza l-assorbiment ta' sustanza; u (2) l-interactions involuti huma prinċiparjament non-polari. B'riżultat ta' dan, dawn il-korrelazzjonijiet: (1) m'humiex, jew huma biss sa ċertu punt, applikabbli għal sustanzi polari, u (2) m'humiex applikabbli f'każijiet fejn il-kontenut tal-materja organika tal-ħamrija hija żgħira ħafna (12). Barra dan, għalkemm instabu korrelazzjonijiet sodisfaċenti bejn P_{ow} u assorbiment (19), ma jistax jingħad l-istess għar-relazzjoni bejn is-solubilità ta'l-ilma u miżura ta' assorbiment (19) (21); s'issa l-istudji huma kontradittorji ħafna.

3. Xi eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-koeffiċjent ta' l-assorbiment u l-koeffiċjent tat-taqsima ta' ilma-ottan, kif ukoll is-solubilità ta' l-ilma huma mogħtija f'Tabelli 1 u 2, ripettivament.

Tabella 1.

Eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-ko-effiċjent tad-distribuzzjoni ta' assorbiment u l-ko-effiċjent tat-taqsima ta' ilma-ottan; għal iktar eżempji (12) (68)

Sustanzi	Korrelazzjonijiet	Awturi:
Ureas sostituti	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Fihom il-kloru aromatiku	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou *et al*. (1983) (65)
Diversi pestiċidi	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Idrokarbon aromatiku	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabella 2.

Eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-ko-effiċjent tad-distribuzzjoni ta' assorbiment u solubilità ta' l-ilma; għal iktar eżempji ara (68) (69)

Kompost	Korrelazzjonijiet	Awturi
Diversi pestiċidi	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Sustanzi li fihom il-kloru, alifatiċi, u aromatiċi	$\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) – (0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α- naftal	$\log K_{oc} = 4,273 – 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Sustanzi aromatiċi, alifatiċi u ċikliċi	$\log K_{oc} = - 1,405 – 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Diversi komposti	$\log K_{om} = 2,75 – 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

ANNESS 4

KALKOLI BIEX JIĠU DEFINITI L-KONDIZZJONIJIET TA' L-AZZJONI ĊENTRIFUGA

1. Il-ħin ta' azzjoni ċentrifuga jingħata bil-formula li ġejja, jekk nassumu li hemm partiċelli sferikali:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Għal skopijiet ta' simplifikazzjoni, il-parametri kollha huma deskritti f'unitajiet non-SI (g, cm).

fejn:

ω = veloċità tar-rotazzjoni (=2 p rpm/60), rad s^{-1};

rpm = dawriet sħaħ għal kull minuta

η = viskożità tas-soluzzjoni, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = radju tal-partiċella, cm

p_s = densità tal-ħamrija, g cm^{-3};

p_{aq} = densità tas-soluzzjoni, g cm^{-3};

$_{Rt}$ = distanza miċ-ċentru ta' rotor ċentrifugu sal-wiċċ tas- soluzzjoni fit-tubu ċentrifugu, cm;

R_b = distanza miċ-ċentru tar-rotor ċentrifuga sal-qiegħ tat- tubu ċentrifugu, cm;

R_b-R_t = l-għoli tal-ħamrija/taħlita tas-soluzzjoni fit-tubu ċentrifugu, cm.

Fil-prattika ġenerali, jiġu użati d-doppju tal-ħinijiet ikkalkulati biex tiġi assigurata separazzjoni kompleta.

2. L-ekwazzjoni (1) tista' tiġi ssimplifikata iktar jekk nikkunisdraw il-viskożità (η) u d- densità (ρ_{aq}) tas-soluzzjoni bħala daqs il-viskożità u d-densità ta' ilma f 25 °C; għalhekk, n = 8,95 × 10^{-3}g $^{1}cm^{-1}$ up$_{aq}$ = 1,0 g.cm^{-3}.

Imbagħad, il-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga jiġi mogħti bl-ekwazzjoni (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Mill-ekwazzjoni 2 jidher ċar li ż-żewġ parametri huma importanti biex tiġi definita l-kondizzjoni ta' l-azzjoni ċentrifuga, i.e. ħin (t) u velocità (rpm), sabiex tinkiseb is-separazzjoni tal-partiċelli ta' daqs speċifiku (fil-każ tagħna radju ta' µm): (1) id-densità tal-ħamrija u (2) it-tul tat-taħlita fit-tubu ċentrifugu (R_b-R_t), i.e. id-distanza li partiċella tal-ħamrija tiksi mill-wiċċ tas-soluzzjoni sal-qiegħ tat-tubu; ovvjament, għal volum fiss it-tul tat-taħlita fit-tubu sejjer jiddependi fuq ir-radiċi kwadrata tar-radju tat-tubu.

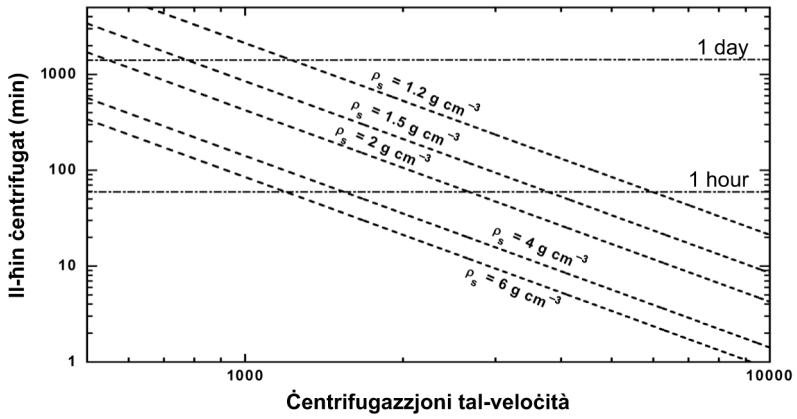
4. Fig. 1 jippreżenta varjazzjonijiet fil-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versu veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal densitajiet ta' ħamrija differenti (ρs) (Fig. 1a) u tulijiet differenti tat-taħlita fit-tubi ċentrifugi(p_s) (Fig. 1b). Minn Fig. 1a l-influenza tad-densità tal-ħamrija tidher ovvja; per eżempju, għall-azzjoni ċentrifuga klassika ta' 3000 rpm il-ħin ta l-azzjoni ċentrifuga huwa bejn wieħed u ieħor 240 min. għal 1,2 g cm^3 densità tal-ħamrija, waqt li huwa 50 min. biss għal 2,0 g cm^{3} Bl-istess mod, minn Fig. 1b, għal azzjoni ċentrifuga klassika ta' 3000 rpm il-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga huwa bejn wieħed u ieħor 50 min. għal tul tat-taħlita ta' 10 cm u huwa ta' 7 min. biss għal tul ta' 1 cm. Madankollu, huwa importanti li tinstab l-aħjar relazzjoni bejn l-azzjoni ċentrifuga li teħtieġ l-inqas tul possibbli u handling faċli għall-esperimentatur biex jissepera l-phases wara l-azzjoni ċentrifuga.

▼B

5. Barra dan, meta jiġu definiti l-kondizzjonijiet esperimentali għas-separazzjoni ta' phases tal-ħamrija/soluzzjoni, huwa importanti li tiġi kkunsidrata l-possibiltà ta' l-eżistenza tat-tielet "pseudo-phase", il-kollojde. Dawn il-partiċelli, ta' daqs inqas minn 0,2 μm, jista' jkollhom impatt importanti fuq il-mekkaniżmu ta' l-assorbiment sħiħ ta' sustanza f suspension tal-ħamrija. Meta l-azzjoni ċentrifuga tiġi esekwita kif spjegat hawn fuq, kollojde jibqgħu fl-aqueous phase u huma suġġetti għal analiżi flimkien m' l-aqueous phase. Għalhekk, l-informazzjoni dwar l-impatt tagħhom tintilef

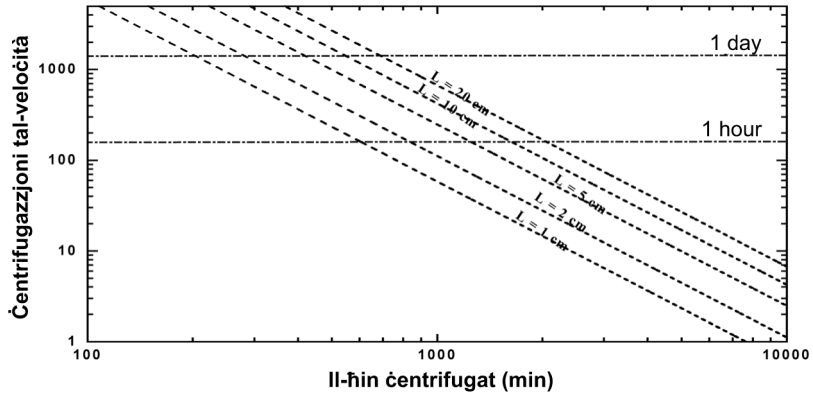
   Jekk il-laboratorju amministrattiv ikollu faċilitajiet ta' azzjoni ultra-ċentrifuga jew ultrafiltrazzjoni, l-assorbiment/desorption ta' sustanza fil-ħamrija tista' tiġi studjata fiktar dettall, inkluża informazzjoni dwar l-assorbiment tas-sustanza fuq il-kollojde. F'dan il-każ, azzjoni ultra-ċentrifuga b'60 000 rpm/min. jew ultrafiltrazzjoni b'porożità tal-filtru ta' 100 000 Daltons għandha tiġi applikata sabiex jiġu sseparati it-tliet phases, ħamrija, kollojde, soluzzjoni. Il-protokoll ittestjat għandu jiġi wkoll modifikat skond il-bżonn, sabiex it-tliet phases kollha jkunu suġġetti għal analiżi tas-sustanza.

Fig. 1a.



Varjazzjonijiet tal-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versu l-veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal densitajiet ta' ħamrija differenti (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}cm^{-1}$ u ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} f 25 °C.

Fig. 1b.



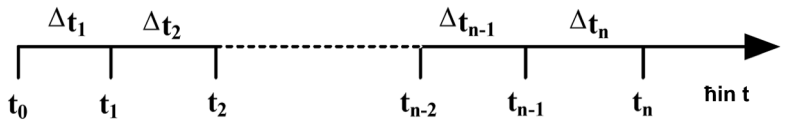
Varjazzjonijiet tal-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versu veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal tulijiet differenti tat-taħlita fit-tubu ċentrifugu (Rb -Rt) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3}g $s^{-1}cm^{-1}$, ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} f' 25 °C u ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

ANNESS 5

KALKOLU TA' ASSORBIMENT A (%) U DESORPTION D (%)

L-iskema tal-ħin tal-proċedura hija:



Għall-kalkoli kollha huwa meqjus li s-sustanza tat-test hija stabbli u ma tassorbix b'mod sinifikanti mal-ġnub tal-kontenitur.

ASSORBIMENT A (A %)

(a) *Metodu parallel*

L-assorbiment perċentwali huwa kkalkulat għal kull tubu tat-testijiet (i) f'kull punt ta' ħin (t_i), skond l-ekwazzjoni:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

It-termini ta' din l-ekwazzjoni jistgħu jiġu kkalkulati kif ġej:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \quad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \quad (3)$$

fejn:

A_{t_i} = il-perċentwal ta' l-assorbiment (%) f'dan il-punt tal-ħin t_i;

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa tas-sustanza ttestjata fuq il-ħamrija fil-ħin t_i li l-analiżi ġiet esekwita (μg)

m_0 = massa tas-sustanza tat-test fit-tubu tat-testijiet, fil-bidu tat-test (μg)

C_0 = konċentrazzjoni tal-massa inizjali tas-soluzzjoni tat-test f'kuntatt mal- ħamrija (μg cm^{-3});

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fl-aqueous phase fil-ħin t_i li fih ġiet esekwita l-analiżi (μg cm^{-3}); din il-konċentrazzjoni hija ffissata analitikament meta jitqiesu l-valuri mogħtija mill-

V_0 = volum inizjali tas-soluzzjoni ttestjata mal-ħamrija (cm^3).

Il-valuri tal-persentaġġ ta' l-assorbiment A_{t_i} jew $C_{aq}^{ads}(t_i)$ huma pplottjati versu ħin u huwa ddeterminat il-ħin li jittieħed biex jintlaħaq l-ekwilibriju tas-sorption. Eżempji ta' plots bħal dawn huma mogħtija f'Fig. 1 u Fig. 2 rispettivament.

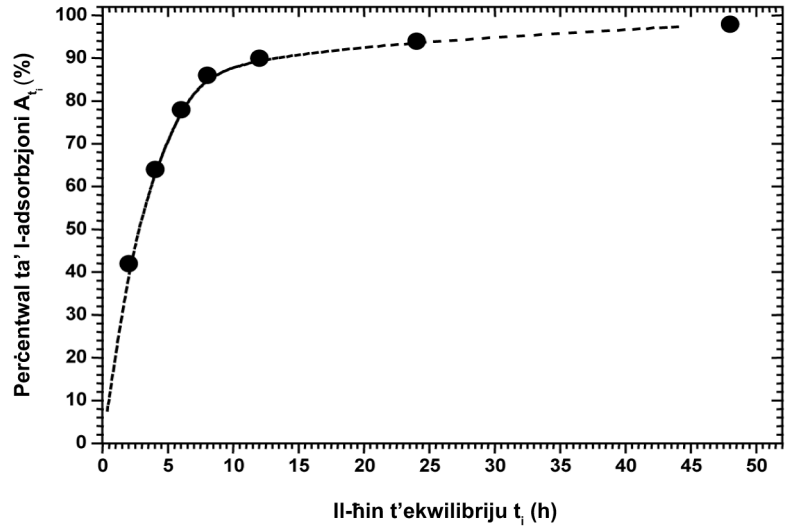


Fig. 1.

Plot ta l-ekwilibriju ta' l-assorbiment

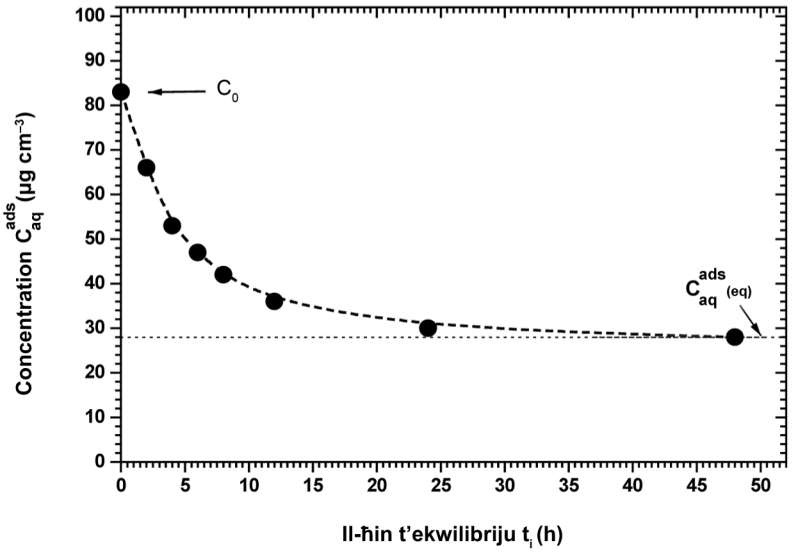


Fig. 2.

Konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza ttestjata fl-aqueous phase (C_{aq}) versu ħin

▼B

(b) *Metodu serial*

L-ekwazzjonijiet li ġejjin jieħdu qies li l-proċedura ta' l-assorbiment hija mwettqa permezz ta' kejl tas-sustanza tat-test f'alikwoti żgħar ta' l-aqueous phase f'intervalli ta' ħin speċifiċi.

— Matul kull intervall ta' ħin l-ammont tas-sustanza assorbita fuq il-ħamrija hija kkalkulata kif ġej:

— għall-ewwel intervall ta' ħin $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— għat-tieni intervall ta' ħin $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— għat-tielet intervall ta' ħin $\Delta t3 = t3 - t2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— għall-nth intervall ta' ħin $\Delta tn = tn - tn - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Il-persentaġġ ta' assorbiment għal kull intervall ta' ħin, $A_{\Delta t_i}$, huwa kkalkulat permezz ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

waqt li l-persentaġġ ta' assorbiment A_{t_i} f' punt tal-ħin $_{ti}$ jingħata b'din l-ekwazzjoni:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Il-valuri ta' l-assorbiment A_{t_i} jew $A_{\Delta t_i}$ (dwar il-bżonnijiet ta' l-istudju) huma pplottjati versu ħin u huwa ddeterminat il-ħin li jittieħed biex jintlaħaq l-ekwilibriju tas-sorption.

— Fil-ħin ta' l-ekwilibriju t_{eq}:

— il-massa tas-sustanza tat-test assorbita fuq il-ħamrija hija:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— il-massa tas-sustanza ttestjata fis-soluzzjoni hija:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— u l-persentaġġ ta' assorbiment waqt ekwilibriju huwa:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Il-parametri użati hawn fuq huma definiti bħala:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), ..., m_s^{ads}(\Delta t_n)$	=	massa tas-sustanza assorbita fuq il-ħamrija matul l-intervalli tal-ħin Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} rispettivament (μg);
$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), ..., m_n^{ads}(t_n)$	=	mass of the substance measured in an aliquot v_a^A at thetime points t_1, t_2,t_n respectively (μg);
$m_s^{ads}(eq)$	=	massa tas-sustanza assorbita fuq il-ħamrija waqt ekwilibriju ta' l-assorbiment (μg);
$m_{aq}^{ads}(eq)$	=	massa tas-sustanza fis-soluzzjoni waqt ekwilibriju ta' l-assorbiment (μg);
v_a^A	=	volum ta' l-alikwot li fih tiġi mkejla s-sustanza ttestjata (cm^3);
$A_{\Delta t_i}$	=	persentaġġ ta' assorbiment li jikkorrispondi f'intervall ta' ħin Δt_i (%);
A_{eq}	=	persentaġġ ta' assorbiment waqt ekwilibriju ta' l-assorbiment (%).

DESORPTION D (%)

Il-ħin t_0 li fih jibda l-esperiment tal-kinetika tad-desorption, huwa kkunsidrat bħala l-mument li l-ikbar ammont ta' volum akkwistat tas-soluzzjoni tas-sustanza tat-test (wara dan jintlaħaq l-assorbiment ta' ekwilibriju) huwa mibdul b'volum ugwali ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$.

(a) *Metodu parallel*

Fil-punt tal-ħin t_i, il-massa tas-sustanza tat-test hija mkejla fl-aqueous phase meħuda mit-tubu i (V^i_r), u l-massa desorbed hija kkalkulata skond din l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Waqt l-ekwilibriju tad-desorption $t_i = t_{eq}$, u għalhekk $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Il-massa tas-sustanza tat-test desorbed matul intervall ta' ħin (At_i) tingħata permezz ta' din l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Il-persentaġġ ta' desorption huwa kkalkulat:

fil-punt tal-ħin t_i mill-ekwazzjoni:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

u matul intervall ta' ħin (Δt_i) mill-ekwazzjoni:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

fejn:

D_{t_i} = il-persentaġġ ta' desorption f punt ta' ħin t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = il-persentaġġ ta' desorption li jikkorrispondi ma' intervall ta' ħin At_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = il-massa tas-sustanza tat-test desorbed f punt tal-ħin t_i, (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = il-massa tas-sustanza tat-test desorbed matul intervall ta' ħin At_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = il-massa tas-sustanza tat-test mkejla analitikament fħin t_i fvolum tas-soluzzjoni V_r^i, li jittieħed għall-analiżi (ug);

m_{aq}^{A} = il-massa tas-sustanza tat-test li tibqa' mill-ekwilibriju ta' assorbiment dovut għall-bdil tal-volum inkomplet (ug);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = il-massa tas-sustanza tat-test fis-soluzzjoni waqt ekwilibriju ta' assorbiment (μg)

V_R = il-volum tas-supernatant imneħħi mit-tubu wara li jintlaħaq ekwilibriju ta' assorbiment u mibdul bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3);

V_r^i = il-volum tas-soluzzjoni meħuda mit-tubu (i) għall-kejl tas-sustanza tat-test, fl-esperiment tal-kinetika tad-desorption (cm^3).

Il-valuri ta' desorption D_{t_i} jew $D_{\Delta t_i}$ (skond il-ħtiġijiet ta' l-istudju) huma pplottjati versu ħin u huwa ddeterminat il-ħin li jittieħed biex jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorption.

(b) *Metodu serial*

L-ekwazzjonijiet li ġejjin jieħdu qies li l-proċedura ta' assorbiment, li kienet ippreċeduta, kienet imwettqa permezz tal-kejl tas-sustanza tat-test f alikwoti żgħar (v_a^A) ta' l-acqueous phase (metodu serial f1.9. Andament tat-test). Huwa meqjus li: (a) il-volum tas-supernatant imneħħi mit-tubu wara l-esperiment ta' l-kinetika ta' l-assorbiment kien mibdul bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ solution (V_R) u (b) u l-volum totali ta' l-aqueous phase fkuntatt mal-ħamrija (V_T)) matul l-esperiment tal-kinetika tad-desorption jibqa' kostanti u jingħata b'din l-ekwazzjoni:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Fpunt tal-ħin t_i:

— il-massa tas-sustanza tat-test hija mkejla falikwot żgħir (v_a^D) u l-massa desorbed hija kkalkulata, skond l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— waqt ekwilibriju ta' desorption $t_i = t_{eq}$ u għalhekk $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— Il-persentaġġ ta' desorption D_{t_i} huwa kkalkulat, mill-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

F'intervall ta' ħin (Δt_i):

Matul kull intervall ta' ħin l-ammont tas-sustanza desorbed huwa kkalkulat kif ġej:

— għall-ewwel intervall ta' ħin $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— għat-tieni intervall ta' ħin $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (22)$$

u

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— għall-nth intervall $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] u \quad (23)$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Finalment, il-persentaġġ ta' desorption għal kull interval ta' ħin, $D_{\Delta t_i}$, huwa kkalkulat permezz ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

waqt li l-persentaġġ ta' desorption D_{t_i} f'punt tal-ħin t_i jingħata permezz ta' l-ekwazzjoni:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

fejn il-parametri użati hawn fuq huma definiti bħala:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = il-massa tas-sustanza li tibqa' assorbita fuq il-ħamrija wara lintervalli tal-ħin Δt_1, Δt_2,..., Δt_nrispettivament (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = il-massa tas-sustanza tat-test matul l-intervalli tal-ħin rispettivament (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = Il-massa tas-sustanza mkejla f'*aliquot*($v^D{}_a$) f'punti tal-ħin t_1,t_2,..., t_n, rispettivament (μg)

V_T = il-volum totali ta' l-aqueous phase f'kuntatt mal-ħamrija matul l-esperiment tal-kinetika tad-desorptionesekwit bilmetodu serial (cm^3);

m_{aq}^A = il-massa tas-sustanza tat-test li jibqa' mill-ekwilibriju ta' lassorbiment dovut għall-bdil tal-volum inkomplet (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = il-volum tas-supernatant mneħħi mit-tubu wara li jintlaħaq ekwilibriju ta' assorbiment u jinbidel bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$(cm^3)

v_a^D = il-volum ta' l-alikwot meħuda bħala kampjun għal skop analitiku mit-tubu (i), matul l-esperiment tal-kinetika tad-desorption mwettaq bil-metodu serial(cm^3);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

ANNESS 6

ASSORBIMENT-DESORPTION FIL-ĦAMRIJA: KARTI GĦAR-RAPPORT TAD-DATA

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut ta' *dry mass* tal-ħamrija (105 °C,12h):.....%

it-temperatura: ..... °C

L-adattament tal-metodu analitiku

Il-ħamrija miżunal	g	
Il-ħamrija: *dry mass*	g	
Il-volum $CaCl_2$ sol.	cm^3	
konk.nominali sol.finali	$\mu g\ cm^{-3}$	
Konk. analitiku sol.finali	$\mu g\ cm^{-3}$	

Il-prinċipju tal-metodu analitiku wżat:

Il-kalibrazzjoni tal-metodu analitiku:

Is-susttanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata

Il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija (105 °C, 12 h): ..... %

it-temperatura: ..... °C

Il-metodoloġija analitika ta' wara: Indirett ☐ Parallel ☐ Serjali ☐

Dirett ☐

It-test ta' adżorbzjoni: il-kamjuni għat-test

	Simbolu	Unitajiet	Il-ħint'ekwili-brazzjoni		Il-ħint'ekwili-brazzjoni		Il-ħint'ekwili-brazzjoni		Il-ħint'ekwili-brazzjoni	
In-nru tat-tubu										
Il-ħamrija miżuna	—	g								
Il-ħamrija: *dry mass*	m_{soil}	g								
Il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kalkulat)	V_{WS}	cm^3								
Il-volum 0,01 M $CaCl_2$ sol. Biex jekwilibrizza l-ħamrija		cm^3								
Il-volum ta' *stock solution*		cm^3								
Il-volum totali tal-fażi akwea. F'kuntatt mal-ħamrija	V_0	cm^3								
Is-soluzzjoni ta' konċentrazzjoni għat-test inizjali	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Is-sustanza tal-massa għat-test fil-bidu tat-test	m_0	µg								

▼B

	Simbolu	Unitajiet	Il-ħint'ekwili-brazzjoni		Il-ħint'ekwili-brazzjoni		Il-ħint'ekwili-brazzjoni		Il-ħint'ekwili-brazzjoni	
Wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni										
IL-METODU INDIRETT										
Il-metodu parallel										
Il-korrezzjoni tal-faži akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Il-metodu serjali										
Il-massa tas-sustanzi għat-test imkejla f'*aliquot*[vaA]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
IL-METODU DIRETT										
Il-massa tas-sustanza għat-test adsorbita fil-ħamrija	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Il-kalkolu ta' l-adżorbzjoni										
L-adżorbzjoni	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Il-medji										
Il-koeffiċjent ta' l-adżorbzjoni	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Il-medji										
Il-koeffiċjent ta' l-adżorbzjoni	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Il-medji										

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut ta' *dry mass* tal-ħamrija (105 °C, 12)

it-temperatura:..... °C

It-test ta' adżorbzjoni: l-imbjanki u l-kontroll

	Simb olu	Unita jiet	Imbjank		Imbjank		l-kontroll	
In-nru tat-tubu								
Il-ħamrija miżuna		g					0	0
L-ammont ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (ikkalkulata)		cm^3					—	—
Il-volum ta' 0,01 M $CaCl_2$ is-soluzzjoni miżjuda		cm^3						
Il-volum ta' l-i*stock solution* tas-sustanza tat-test miżjuda		cm^3	0	0				
It-total tal-volum tal-faži akwea (ikkalkulata)		cm^3					—	—

▼B

	Simb olu	Unita jiet	Imbjank		Imbjank		l-kontroll	
Il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza għat-test fil-fażi akwea		µg cm^{-3}						
Wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni								
Il-konċentrazzjoni fil-fażi akwea		µg cm^{-3}						

Rimarka: Żid il-kolonni jekk inhumeħtieġ

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija (105 °C 12 s):..... %

it-temperatura: .... °C

Il-bilanċ tal-massa

	simbolu	unitajiet				
Nru tat-tubu						
il-ħamrija miżuna	—	g				
Il-ħamrija: *dry mass*	ms_{oil}	g				
il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kkalkulat)	V_{WS}	ml				
il-volum 0,01 M CaCl2 sol, biex tiġi ekwilibrizzata l-ħamrija		ml				
Il-volum ta' *stock solution*		cm^3				
Il-volum totali tal-fażi akwea f'kuntatt mal-ħamrija	V_0	cm^3				
is-soluzzjoni inizjali tat-test tal-konċentrazzjoni	C_0	µg cm^{-3}				
il-ħin ta' ekwilibrazzjoni	—	h				
wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni						
Il-korrezzjoni tal-fażi akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
il-ħin ta' ekwilibrazzjoni t	t_{eq}	h				
l-ewwel *dilution* bis-solvent						
Il-volum imneħħi tal-fażi akwea	V_{rec}	cm^3				
Il-volum miżjud tas-solvent	ΔV	cm^3				
l-ewwel estrazzjoni bis-solvent						
Is-sinjal analizzat fis-solvent	S_{E1}	var.				
konk. Sust. Għat-test. fis-solvent	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	simbolu	unitajiet				
Il-massa tas-sustanza meħuda mill-ħamrija u minn mal-ġnub tar-reċipjent	m_{E1}	µg				
It-tieni *dilution* bis-solvent						
Il-volum imneħħi tas-solvent	ΔV_s	cm^3				
Il-volum miżjud tas-solvent	$\Delta V'$	cm^3				
It-tieni estrazzjoni bis-solvent						
is-sinjal analizzat fil-faži tas-solvent	S_{E2}	var.				
konk. test subst. in solvent	C_{E2}	µg cm^{-3}				
il-massa tas-sustanza meħuda mill-ħamrija u minn mar-reċipjent	m_{E2}	µg				
Il-massa totali tas-sust. għat-test. meħuda f'żewġ fażijiet	m_E	µg				
il-bilanċ tal-massa	MB	%				

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija(105 °C, 12h):…… %

it-temperatura:…… …….…….. °C

L-adżorbzjoni ta' l-isotermi

	simbolu	unitajiet								
Nru tat-tubu										
il-ħamrija miżuna	—	g								
Il-ħamrija: *dry mass*	E	g								
il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kkalkulat)	V_{WS}	cm^3								
Il-volum 0,01 M $CaCl_2$ sol. Biex tiġi ekwlibrizzata l-ħamrija		cm^3								
Il-volum ta' l-i*stock solution* miżjud		cm^3								
Il-volum totali tal-faži akwea f'kuntatt mal-ħamrija (calculated)	V_0	cm^3								
Soluzzjoni ta' konċentrazzjoni	C_0	µg cm^{-3}								
il-ħin ta' ekwilibrazzjoni	—	h								

▼B

	simbolu	unitajiet								
wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni										
Il-korrezzjoni tal-faži akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
it-temperatura		°C								
Il-massa ta' ladżorbzjoni kull unità ta' ħamrija	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

L-analiżi ta' rigressjoni:

valur ta' K_F^{ads}:

valur ta' l/n:

il-koeffiċjent tar-rigressjoni r^2:

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija(105 °C, 12 s):…..%

it-temperatura:… ……°C

Il-metodoloġija analitika ta' wara: Indirett ☐ Parallel ☐ Serjali ☐

It-test ta' dežorbzjoni

		simbolu	unitajiet	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni	Il-ħint'ekwilibrazzjoni
Nru tat-tubu ġej mill-faži ta' adżorbzjoni							
Il-massa tas-sustanza assorbita fuq il-ħamrija f'ekwilibriju ta' adżorbzjoni		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Il-volum tal-faži akwea mneħħija, rimpjazzat minn 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Il-volum totali tal-faži akwea F'kuntatt mal-ħamrija	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Il-massa tas-sustanza għattest imħollija fl-ekwilibriju ta' l-adżorbzjoni minħabba ir-rimpjazzament tal-volum inkomplut		m_{aq}^{A}	µg				
Il-kinetiċi tad-dežorbzjoni							
Il-massa mkejla tas-sustanza disorbita mill ħamrija fil-ħin t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Il-volum tas-soluzzjoni meħud mit-tubu (i) għal Il-kejl tas-sustanza għat-test	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Il-massa tas-sustanza disorbita mill-ħamrija fil-ħin t_i (ikkalkulat)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Il-massa tas-sustanza disorbita mill-ħamrija il-ħin ta' l-intervall Δt_i (ikkalkulat)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	simbolu	unitajiet	Il-ħint'ek-wili-brazzjoni	Il-ħint'ek-wili-brazzjoni	Il-ħint'ek-wili-brazzjoni	Il-ħint'ek-wili-brazzjoni
Il-perċentwal tad-dežorbzjoni						
Id-dežorbzjoni fil-ħin t_i	D_{ti}	%				
Id-dežorbzjoni fl-intervall Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Il-koeffiċjent tad-dežorbzjoni apparenti	K_{des}					

MP: Il-metodu parallel

MS: Il-metodu serjali

▼B

C.19. **ESTIMAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENT TA' ADSORPTION (K_{OC}) FUQ IL-ĦAMRIJA U FUQ ĦAMA TAD-DRENAĠĠ BL-UŻU TA' KROMATOGRAFIJA TA' LIKWIDU LI JIPPERFORMA GĦOLI (HPLC)**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa replika tal-OECD TG121 (2001).

1.1. DAĦLA

L-aġir ta' sorpzjoni tas-sustanzi fil-ħamrija u fil-ħama tad-drenaġġ jista' jkun deskritt permezz ta' parametri li jkunu determinati b'esperimentar permess tal-metodu tat-testjar C.18. Parametru importanti huwa l-koeffiżjent tal-assorbiment li huwa mfisser bħala r-ratio bejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-ħamrija/ħama u l-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-fażi akwatika fuq l-ekwilibriju tal-assorbiment. Il-koeffiċjent tal-assorbiment normalizzat għall-kontenut karboniku organiku fil-ħamrija K_{oc} huwa indikatur utili għall-kapaċita vinkolanti ta' kimika fuq materja organika tal-ħamrija jew ħama tad-drenaġġ u jippermetti li wieħed jikkompara bejn kimiċi differenti. Dan il-parametru jista' jkun estimat minn korrelazzjonijiet mas-solubilita fl-ilma u in- n-octanol/koeffiċjenta' diviżjoni ta' l-ilma (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Il-metodu ta' esperimentar deskritt f'dan it-test juża' l-HPLC għall-estimu tal-koeffiċjent tal-assorbiment K_{oc} fil-ħamrija u fil-ħama tad-drenaġġ (8). L-estimi huma aktar ta' min wieħed jafdahom minn dawk tal-kalkolazzjoni QSAR (9). Bħala metodu ta' stima ma tistax tieħu post kompletament il-lott ta' esperimenti ta' ekwilibriju użati fil-metodu ta' test C18. Madankollu, il-K_{oc} estimata tista' tkun utili meta tiġI biex tagħżel paramentri ta' testijiet xierqa għal studji ta' assorbiment/desorpzjoni skond il-metodu ta' test C.18 billi tikkalkula l-K_d (koeffiċjent ta' distribuzzjoni) jew K_f (Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich) skond l-equation 3 (ara taqsima 1.2).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

K_d: Il-koeffiċjenti ta' distribuzzjoni huwa deskritt bħala r-ratio tal-konċentrazzjonijiet ta' ekwilibriju C ta' test fuq sustanza li kien imdewweb permezz ta' sistema ta' żewġ fażijiet li tikkonsisti f'sorbent (ħamrija jew ħama tad-drenaġġ) u fażi akwatika; hija valur mingħajr dimensjoni fejn konċentrazzjonijiet fiż-żewġ fażi huma espressi skond bażi ta' piż/piż. Fil-każ illi l-konċentrazzjoni fil-fażi akwatika hija mogħtija bħala bażi ta' piż/volum, hemmhekk il-units huma ml· g^{-1}. K_d tista' tvarja skond il-kwalitajiet ta' sorbent u tista' tkun dipendenti fuq is-solubilità.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} or \frac{C_{slud}}{C_{aq}} \quad (1)$$

meta:

C_{soil} = konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-ħamrija f ekwilibriju (μg· g^1)

C_{slud} = konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-ħama f ekwilibriju (μg· g^1)

C_{aq} = konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-fażi akwatika fekwilibriju (μg· g^{-1}, μg· ml^{-1}).

▼B

K_f: Il-Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-ħamrija jew ħama tad-drenaġġ (x/m) meta l-konċentrazzjoni tal-ekwilibriju C_{aq} fil-fażi akwatika hija ugwali għall-wieħed; units huma $ng.g^{1}$ sorbent. Il-valur jista' jvarja skond il-kwalitajiet tas-sorbent.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

fejn:

x/m = ammont ta' sustanza taħt prova x (μg) assorbiti f ammont ta' sorbent m (g) f'ekwilibriju

1/n = niżla ta' isoterm ta' assorbiment ta' Freundlich

C_{aq} = konċentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-fażi akwatika f 'ekwilibriju ($\mu g \cdot ml^{-1}$)

$AtC_{aq} = 1$; $\log K_f = \log \frac{x}{m}$

K_{oc}: Distribution coefficient (K_d) jew Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich (K_f) normalizzat għall-kontenut ta' carbon organiku (f_{oc}) ta' sorbent; partikolarment għall-kimiċi li mhumiex ionizzata, huwa indikazzjoni approssimattiva għall-estent ta' assorbiment bejn is-sustanza u s-sorbent u jaċċetta li wieħed ikun jista' jikkompara bejn kimiċi different. Skond id-dimensjoni ta' K_d u K_f, K_{oc} tista' tkun mingħajr dimensjoni jew ikollha l-units $ml \cdot g^{1}$ jew $\mu g.g^{1}$ materja organika.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\left(\text{dimensionless or } ml \cdot g^{-1}\right) \text{ or } \frac{Kf}{foc}\left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Ir-relazzjoni bejn K_{oc} u K_d mhijiex dejjem lineari u għalhekk valuri ta' K_{oc} jistgħu jvarjaw minn ħamrija għall-ħamrija imma l-varjabilita' tista' tkun ridotta drastikament meta kkomparata ma' valuri K_d jew K_f.

Il-Koeffiċjent ta' assorbiment (Koc) huwa mnaqqas mill-fattur ta' kapacita' (k') bl-użu ta' plot ta' kalibrazzjoni ta' log k' kontra log K_{oc} tat-taħlita magħżula bħala riferenza.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

fejn:

t_R = HPLC ħin ta' ritenzjoni tat-test u sustanza ta' riferenza (minuti)

t_0 = HPLC ħin mejjet (minuti) (ara taqsima 1.8.2).

P_{OW}: Il-koeffiċjenti tad-diviżjoni ta' octanol-ilma huwa deskritt bżala r-ratio tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza mdewba f'n-octanol u ilma; huwa valur mingħajr dimensjoni.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq} \ (= Kow) \quad (5)$$

1.3. SUSTANZI TA' RIFERENZA

Il-formula ta' struttura, il-purita' u l-konstant tad-dissoċjazzjoni (jekk mixtieqa) għandha tkun magħrufa qabel jintuża dan il-metodu. Informazzjoni dwar is-solubilita' fl-ilma u f'solventi organiċi, f'diviżjoni ta' koeffiċjenza ta' octanol-ilma u l-karatteristiċi ta' hydrolysis huma utili.

▼B

Sabiex tirrelata d-data ta' retezjoni tal-HPLC kif imkejla ta' sustanza taħt test bil-koeffiċjenti tal-assorbiment tagħha, graff ta' kalibrazzjoni ta' log K_{oc} kontra log k' għandha tkun stabbilita. Minimu ta' sitt punti ta' riferenza, mill-inqas wieħed 'il fuq u wieħed l-isfel mill-valur pretiż tas-sustanza taħt prova għandhom ikunu użati. Ir-reqqa tal-metodu jkun aktar mtejjeb sinjifikament jekk ikunu wżati sustanzi ta' riferenza li huma relatati strutturalment mas-sustanza taħt prova. Jekk din id-data mhijiex disponibbli, sta għall-utent illi jagħżel s-sustanzi ta' kalibrazzjoni xierqa. Sett aktar ġenerali ta' sustanzi strutturalment eteroġeniċi għandhom ikunu mgħażula f'dan il-każ. Sustanzi u valuri ta' K_{oc} li jistgħu jkunu użati huma mniżżla fl-Anness f'Tabella 1 għall-ħama ta' drenaġġ u f'Tabella 3 għall-ħamrija. L-għażla ta' sustanzi oħra ta' kalibrazzjoni għandha tkunu ġustifikati.

1.4. PRINĊIPJITAL-METODU TA' PROVA

HPLC huwa magħmul fuq kolonni analitiċI ippakkjati b'faži solida ta' cyanopropyl disponibbli kummerċjalment li fih jinstabu biċċiet ta' ipofiliċi u polari. Faži stazzjonarja li hi moderalment polari bbażata fuq matrix ta' silica hija użata:

– O – Si	– CH_2 – CH_2 – CH_2	– CN
silica	non-polar spacer	polar moiety

Il-prinċipju tal-metodu ta' prova huwa simili għall-metodu ta' testjar A.8 (koeffiċjent ta' diviżjoni, metodu HPLC). Waqt li tgħaddi mill-kolonna flimkien mall-faži mobbli, is-sustanza taħt prova għandha effett mall-faži stazzjonarja. Bħala riżultat diviżjoni o bejn fażijiet mobbli u stazzjonarju s-sustanza taħt prova hija mdewwma. Iż-żewġ komposizzjonijiet tal-faži stazzjonarja li għandhom sites polari u mhux polari jaċċettaw effett ma' gruppi polari u mhux polari ta' molekuli simili bħal fil-każ ta' materji organiċi f'matrices fil-ħamrija jew fi ħama tad-drenaġġ. Dan jagħmel possibbli r-relazzjoni bejn il-ħin ta' ritenzjoni fil-kolonna u l-koeffiċjent ta' assorbiment f'materji organiċi li jista' jkun stabbilit.

pH għandu influwenza sinjifikattiva fuq l-atteġġjament ta' sorpzjoni partikolarment f'sustanzi polari. Għall-ħamrija agrikola jew tankijiet ta' impjanti ta' trattament ta' drenaġġ il-pH normalment tvarja bejn pH 5,5 u 7,5. Għal sustanzi ionizzabbli, żewġ testijiet għandhom ikunu magħmula b' formi kemm ionizzati u kemm mhux ionizzati f'soluzzjonijiet ta' buffer xierqa, imma dan biss f'każijiet fejn mill-inqas 10 % tal-kompost taħt prova jkun dissoċjati bejn pH 5,5 u s-7,5.

Billi r-relazzjoni biss bejn ir-ritenzjoni fuq il-kolonna ta' HPLC u l-koeffiċjent ta' adżorbzjoni huwa użat għall-evalwazzjoni, mhux rikjest li jkun hemm il-metodu ta' analizzar kwantitattiv u jkun biss neċessarju d-determinazzjoni tal-ħin ta' retention. Jekk ikun disponibbli sett ta' sustanzi ta' riferenza u jkunu jistgħu jiġu wżati kondizzjonijiet standard ta' esperimentar, il-metodu jipprovdi mezz aktar mgħaġġla u effiċjenti sabiex ikun hemm estimu tal-koeffiċjent K_{oc} ta' assorbiment.

1.5. APPLIKABBILITÀ TAT-TEST

Il-metodu HPLC huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi (kemm jekk mingħajr tikketta u jekk bit-tikketta) għal xhiex sistema ta' skoperta xierqa (eż. spectrofotometer, ta' radjoattività) hija disponibbli u li huma suffiċjentament stabbli waqt il-lant tal-esperiment. Jista' jkun partikolarment bżonnjuż għall-kimiċi li huma diffiċli illi jkunu studjati f'sistemi oħra ta' esperimentar (i.e. sustanzi volatili; substanzi li ma jinħallux fl-ilma f'konċentrazzjoni illi tista' tiġi mkejla analitikament; substanzi li għandhom affinita qawwija għas-surface tas-sistemi ta' inkubazzjoni). Il-metodu jista' jkun użat għat-taħlit illi jagħtu elution bands mhux risolti. F'każijiet bħal dawn, limiti 'l fuq u 'l isfel tal-valuri tal-log Koc tal-kompost tat-taħlit taħt prova għandhom ikunu magħrufa.

▼B

Xi kultant impuritajiet jistgħu jikkawżaw problemi fl-interpretazzjoni tar-riżultati tal-HPLC, imma dawn huma ta' imprtanza minuri kemm-il darba s-sustanza taħt prova tista' analitikament tkun identifikabbli kjarament u sseparata mill-impuritajiet.

Il-metodu huwa validat għal sustanzi mniżżla f'Tabella 1 fl-Anness u kien ukoll applikat għal varjeta ta' kimiċi oħra li jagħmlu parti mill-klassijiet ta' kimiċi kif ġejjin:

— amines aromatiċi (eż trifluralin, 4-chloroaniline, 3,5-dinitroaniline, 4-methylaniline, N-methylaniline, 1-naphthylamine),

— *carboxilic acid esters aromatic* (eżbenzoic acid methylester, 3,5-dinitrobenzoic acid ethylester),

— hydrocarbons aromatiċi (eż toluene, xylene, ethylbenzene, nitrobenzene),

— aryloxyphenoxypropionic acid esters (eż *diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl*, *fenoxaprop-P-ethyl*),

— *benzimidazole* u *imidazole fungicides* (eż *carbendazim, fuberidazole*, *triazoxide*),

— *carboxilic acid amides* (eż 2-*chlorobenzamide, N,N-dimethylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide, N-methylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide*),

— *chlorinated hydrocarbons* (eż *endosulfan, DDT, hexachlorobenzene, quintozene, 1,2,3-trichlorobenzene),*

— *organophosphorus insecticides* (eż *azinphos-methyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos*),

— *phenols* (eż *phenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, pentachlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, 1-naphthol*),

— *phenylurea derivatives* (eż. *isoproturon, monolinuron, pencycuron*),

— *pigment dyestuffs* (eż *acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81*),

— *polyaromatic hydrocarbons* (eż *acenaphthene, naphthalene*),

— *1,3,5-triazine herbicides* (eż *prometryn, propazine, simazine, terbutryn*),

— *triazole derivatives* (eż *tebuconazole, triadimefon, tradimenol, triapenthenol*).

Il-metodu mhuwiex applikabbli għal sustanzi li jagħmlu reazzjoni jew mall-eluent jew mall-fażi stazzjonarja. Mhuwiex applikabbli wkoll għal sustanzi illi jagħmlu reazzjoni b'mod speċifiku ma' taħlit inorganiku (eż formażżjoni ta' gzuz kumplessi ma' minerali taċ-ċaqquf). Il-metodu jista' ma jaħdimx għal sustanzi attivi li jitilgħu fil-wiċċ, kompost inorganiku u aċidi jew bażijiet moderati jew b'saħħithom. Valuri ta' Log K_{oc} bejn il-1,5 sal-5,0 jistgħu jiġu ddeterminati. Sustanzi inonissabbli għandhom ikunu mkejla permezz ta' l-użu ta' fażi mmobbli buffered, imma wie'ed għandu jieħu ħsieb illi jevita l-preċipitazzjoni ta' komponimenti ta' buffer jew sustanza taħt prova.

▼B

1.6. KRITERJA TA' KWALITÀ'

1.6.1. **Akkuratezza**

Normalment, il-koeffiċjent ta' assorbiment ta' sustanza taħt prova jkun estimat bejn il-± 0,5 unit ta' log tal-valur determinat bil-metodu tal-ekwilibrju tal-grupp (ara Tabella 1 fl-Anness). Akkuratezza ogħla tista' tiġi milħuqa jekk is-sustanza ta' riferenza użata hija strutturalment relatata mas-sustanza taħt prova.

1.6.2. **Ir-rata tar-repetizzjoni**

Determinazzjonijiet għandhom isiru mill-inqas f'darbtejn. Il-valuri ta' log K_{oc} meħuda mill-kejl individwali għandu jkun bejn il-unit ta' 0,25 log.

1.6.3. **Riproduċibbilità**

Esperjenza milħuqa sa issa fl-applikazzjoni tal-metodu hija ta' sosten għall-validita' tagħha. Investigazzjoni tal-metodu ta' HPLC, bl-użu ta' 48 sustanza (l-aktar minnhom pestiċidi) għal liema kien hemm diġa disponibbli data dwar K_{oc} ta' min wieħed joqgħod fuqha tal-koeffiċjent ta' korrelazzjoni ta' R = 0,95 (10) (11).

Test ta' komparazzjoni magħmul f'laboratorju bil-parteċipazzjoni ta' 11-il laboratorju ġie magħmul sabiex jirranġa u jivvalida il-metodu (12). Ir-riżultati huma mogħtija f'Tabella 2 fl-Anness.

1.7. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' PROVA

1.7.1. **Estimazzjoni preliminari tal-koeffiċjent ta' assorbiment**

Il-koeffiċjent P_{ow} (= K_{ow}) ta' diviżjoni ta' octanol-ilma u sa ċertu punt, is-solubilita fl-ilma jistgħu jintużaw bħala indikaturi ai fini tal-assorbiment, partikolarment għal sustanzi li mhumiex ionizzati, u għalhekk jistgħu jintużaw sabiex jinstab il-limitu preliminari. Varjeta' ta korrelazzjonijiet bżonnjużi ġew ippubblikati għall-diversi gruppi ta' kimiċi (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Apparat**

Kromatograf likwidu, li miegħu ġie mwaħħal pompa pulse-free u mekkaniżmu xieraq ta' detection huwa meħtieġ. L-użu ta' valv ta' injezzjoni b'loop ta' injezzjoni huwa rikkmandat. Resins magħmula minn kimiċu ta' cyanopropyl magħquda kommerċjalment fuq bażi ta' silica għandhom ikunu użati (eż Hypersil u Zorbax CN). Kolonna ta' gwida ta' l-istess materjal tista' tkun impoġġija bejn is-sistema ta' injezzjoni u l-kolonna analitika. Kolonni minn fornituri differenti jistgħu jvarjaw konsiderevolment fl-effiċjenza tas-separazzjoni tagħhom. Bħala gwida, il-fatturi ta' kapaċita k' li ġejjin għandhom ikunu milħuqa: log k' > 0,0 għal log K_{oc} = 3,0 u log k' > 0,4 għal log K_{oc} = 2,0 meta tuza methanol/ilma 55/45 % bħala fażi mobbli.

1.7.3. **Fażijiet mobbli**

Diversi ġew ittestjati, u it-tnejn li ġejjin huma rrikmandati:

— methanol/ilma (55/45 % v/v),

— methanol/0,01M citrate-buffer pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

HPLC grade methanol u ilma distillat jew citrate buffer huma użati sabiex jiġi ppreparat is-solvent ta' elutar. It-taħlita hija iddigassjata qabel ma tiġi użata. Eluzzjoni isokratika għandha tkun użata. Jekk taħlit ta' methanol/ilma mhuwiex ritenut xieraq, taħlit organiku ieħor ta' other solvent/ilma jista' jiġi ppruvat, eż. ethanol/ilma jew taħlita ta' acetonitrile/ilma. Għal kompost ionizzabbli, l-użu ta' soluzzjoni ta' buffer hija rrikmandata sabiex tkun stabilizzata l-pH. Wieħed għandu jieħu ħsieb illi tkun evitata preċipitazzjoni ta' melħ u deterjorazzjoni ta' kolonni, li jista' jiġri waqt it-taħlit ta' xi phase/buffer organiċi.

L-ebda addittiv bħal reagents ta' ion pair jistgħu jiġu użati minħabba li dawn jistgħu jaffetwaw il-kwalifiki ta' sorpzjoni tal-faži stazzjonarja. Dawn il-kambjamenti fil-faži stazzjonarja jistgħu jkunu irriversibbli Għal din ir-raġuni, huwa obbligatorju illi esperimenti li fihom jintużaw addittivi għandhom isiru f'kolonni separati.

1.7.4. **Solutes**

Sustanzi taħt prova u ta' riferenza għandhom ikunu maħlulin fil-faži mobbli.

1.8. PRESTAZZJONI TAT-TEST

1.8.1. **Il-kondizzjoni tat-test**

Waqt il-kejl it-temperatura għandha tkun irrekordjata. L-użu ta' kompartament ta' kolonna hija rrikmandata ħafna sabiex tiggarantixxi kondizzjonijiet stabbli waqt il-kalibrazzjoni u r-runs ta' estimi u kejl tas-sustanza taħt prova.

1.8.2. **Determinazzjoni dead time to**

Għad-determinazzjoni tal-dead time għaż-żewġ metodi differenti jistgħu jiġu użati (ara wkoll taqsima 1.2).

1.8.2.1. *Determinazzjoni ta' ħin mejjet permezz ta' serje omologi*

Din il-proċedura wriet illi tagħti valuri ta' min wieħed joqgħod fuqhom u li huma standard. Għad-detallji ara l-metodu tat-testjar A.8: koeffiċjent ta' diviżjoni (n-octanol/ilma), metodu HPLC.

1.8.2.2. *Determinazzjoni ta' ħin mejjet permezz ta' sustanzi inert li mhumiex miżmuma mill-kolonna*

Dan il-metodu ta' teknika huwa bbażat fuq injezzjoni ta' soluzzjonijiet ta' formamide, urea u nitrat tal-kubrit. Il-kejl irid ikun magħmul mill-inqas darbtejn.

1.8.3. **Determinazzjoni tad-drabi tar-ritenzjoni tR**

Sustanzi ta' riferenza għandhom ikunu magħżula kif deskritt f'taqsima 1.3. Jistgħu jkunu injettati bħala taħlita standard sabiex ikun stabbilit id-drabi tagħhom tar-ritenzjoni, kemm-il darba jkun ikkonfermat illi l-ħin ta' ritenzjoni ta' kull standard ta' riferenza ma jkunx affetwat bil-preżenza ta; standards oħra ta' riferenza. Il-kalibrazzjoni għandha tkun magħmula f'intervalli regolari mill-inqas darbtejn kuljum sabiex jieħdu konsiderazzjoni ta' xi kambjamenti mhux maħsuba fil-kolonna tal-prestazzjoni. Għall-aħjar prattika, l-injezzjonijiet ta' kalibrazzjoni għandhom ikunu magħmula qabel u wara l-injezzjonijiet tas-sustanza taħt prova sabiex ikun ikkonfermat illi l-ħin ta' ritenzjoni ma kienx injorat. Is-sustanzi taħt prova huma injettati separatament fi kwantitajiet kemm jista' jkun żgħar (sabiex jevitaw overload ta' kolonni) u l-ħinijiet tagħhom ta' ritenzjoni jkunu determinati.

▼B

Sabiex tiżdied il-kunfidenza fil-kejl, mill-inqas żewġ determinazzjonijiet għandhom ikunu magħmula. Il-valuri ta' log K_{oc} miġjuba mill-kejl individwali għandhom ikunu bejn il-0,25 log unit.

1.8.4. **Evalwazzjoni**

Il-fatturi ta' kapaċita' k' huma kkalkolati mill-ħin mejjet t_o u sal-ħinijiet ta' ritenzjoni t_R tas-sustanzi tar-referenza kif magħżula skond l-equation 4 (ara taqsima 1.2). Id-*data* tal-log k' tas-sustanzi ta' referenza huma mbagħad ipplottjati kontra il-valuri tal-log K_{oc} tagħhom mill-esperimenti ta' ekwilibriju fil-gruppi mogħtija f'Tabelli 1 u 3 tal-Anness. Bl-użu ta' dan il-plot, il-valur ta' log k' tas-sustanza taħt prova hija mbagħad użata sabiex ikun jista' jiġi stabbilit il-valur ta' log K_{oc} tagħha. Jekk ir-riżultati attwali juru illi l-log Koc tas-sustanzi taħt prova hija barra l-limitu ta' kalibrazzjoni, it-test għandhu jerġa jiġi magħmul bl-użu ta' sustanzi differenti, aktar xierqa.

2. **DATA U RRAPURTAR**

Ir-rapport għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

— identita' tas-sustanzi taħt prova u bħala riferenza u l-purita tagħhom, u l-valuri pK_a jekk rilevanti,

— deskrizzjoni ta' apparat u kondizzjonijiet tal-operat eż. tip u dimensjoni tal-kolonna analitika (u gwida), il-metodu ta' identifikar, faži mobbli (ratio ta' komponimenti u pH), il-limiti ta' temperatura waqt il-kejl,

— ħin mejjet u l-metodu użat sabiex ikun determinat,

— kwantitajiet ta' sustanzi taħt prova u bħala riferenza introdotti fil-kolonna,

— ħinijiet ta' ritenzjoni tal-kompost ta' riferenza użat għall-kalibrazzjoni,

— dettalji tal-linja ta' rigressjoni kif mdaħħla (log k' vs log K_{oc}) u l-graff tal-linja ta' rigressjoni,

— medja tad-*data* ta' ritenzjoni u l-valur ta' d log K_{oc} estimat għall-kompost taħt prova.

— chromatograms.

3. **REFERENZI**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adżorbzjoni coefficient (Koc) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adżorbzjoni, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pġ. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic between soil organic matter and water. Sci. Technol., 17, pġ. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic, Science, 106, pġ. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pġ. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pġ. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adżorbzjoni coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pġ. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pġ. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pġ. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient on soil-results of a ring. Chemosphere, 30(7), pġ. 1373-1384.

▼B

ANNESS

Tabella 1

Komparazzjoni ta' valuri ta' Koc għall-ħamrija u ħama tad-drenaġġ, u valuri ikkalkolati bil-metodu tal-iscreening tal-HPLC ([1]), ([2])

Sustanza	CAS Nr.	Log Koc drenaġ ġ ħama	log Koc HPL C	Δ	log Koc ħamri ja	log Koc HPL C	Δ
Atrazine	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phenanthrene	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoic acid phenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 – 128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adżorbzjoni-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

Tabella 2

Riżultati ta' testijiet inter-komparabbli f'laboratorji (11 –il laboratorju parteċipanti) magħmula sabiex jagħmlu aħjar u jivvalidaw il-metodu ta' HPLC ([1])

Sustanza	CAS Nr.	log K_{oc}	$K_{oc\ log}$	K_{oc}
		[OECD 106]	[Metodu HPLC]	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adżorbzjoni coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

▼B

Tabella 3

Sustanzi ta' riferenza rrikomandati għall-metodu tal-iscreening tal-HPLC ibbażat fuq id-data ta' assorbiment tal-ħamrija

Sustanza ta' riferenza	CAS Nr.	Log K_{oc} mean valuri minn grupp ekwilibriju	Numru ta' data ta' K_{oc}	log S.D.	Ejgħun
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Phenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N.N-dimethylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Methylbenzamide	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Methylbenzoate	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazine	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamide	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naphthalene	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Trichlorobenzene	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Phenanthrene	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
(c) Id-*data* provduta mill-industrija.

▼B

C.20. *DAPHNIA MAGNA* REPRODUCTION TEST

1. METODU

Dan il-metodu ta' test tossiku tar-riproduċibilità huwa replika tal-OECD TG 211 (1998).

1.1. DAĦLA

L-għan primarju tat-test huwa li jkun hemm stima tal-effetti tal-kimiċi fuq il-prodott riproduttiva tal-*Daphnia magna*.

1.2. TIFSIR U UNITS

Annimali ġenituri: huma dawk id-*Daphnia* femminili illi huma preżenti fil-bidu tat-test u illi l-prodott riproduttiva tagħhom huwa l-oġġettiv ta' l-istudju.

Wild: huma d-*Daphnia* żgħar prodotti mill-annimali ġenituri waqt it-test.

L-inqas effett ta' konċentrazzjoni osservata (LOEC): hija l-inqas konċentrazzjoni pprovata meta s-sustanza hija osservata illi kellha effett statistikalment sinifikanti fuq ir-riproduzzjoni u mhux il-mortalita tal-ġenituri (fejn $p < 0,05$) meta komparata mall-kontroll, fi żmien espost stabbilit. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet kollha taħt prova 'il fuq mill-LOEC għandhom ikollhom effett daneġġuż ugwali jew aktar minn dak osservat fil-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kondizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu sodisfatti, trid tingħata spjegazzjoni kompluta ta' kif ġiet magħżula l-LOEC (u b'hekk in-NOEC).

L-ebda effett osservat tal-konċentrazzjoni (NOEC): huwa t-test tal-konċentrazzjoni eżatt l-isfel mill-LOEC, li meta kkomparat mall-kontroll, m'għandu l-ebda effett statistikament sinjifikanti ($p < 0,05$), fi żmien espost stabbilit.

EC_x: hija il-konċentrazzjoni tas-sustanza taħt prova illi dagħbet fl-ilma b'riżultat f'riduzzjoni ta' x % f'riproduttiva tal-*Daphnia magna* fi żmien espost stabbilit.

Rata intrinsika ta' żieda: hija l-kejl fit-tkabbir tal-popolazzjoni li tintegra mall-prodott riproduttiva u mal-mortalità skond kif speċifikat skond l-età (20) (21) (22). F'popolazzjonijiet ta' pajjiżi standard din tkun żero. Għall-popolazzjonijiet illi qegħdin jikbru din tkun posittiva u għall-popolazzjonijiet li qegħdin jonqsu din tkun negattiva. Kjarament, tal-aħħar mhux sostitwibbli u fl-aħħar mill-aħħar dan jiġi estint.

Limitu tal-għarfien: huwa l-inqas konċentrazzjoni illi jista' jkun nstabu iżda mhux ikkwantifikat.

Limitu ta' determinazzjoni: huwa l-inqas konċentrazzjoni illi jista' jkun imkejjel kwantittivament.

Moralità: annimali huwa reġistrat bħala mejjet meta jkun immobbli, i.e. meta ma jkunx aktar kapaci illi jgħum, jew jekk ma jkunx osservat ebda moviment tal-appendiċi jew post-abdomen, fi żmien 15-il sekonda minn meta jkun hemm aġitazzjoni ġentili tal-kontenitur tat-test. (Jekk tintuża definizzjoni oħra, din għandha tkun irraportata flimkien mar-riferenza tagħha)

▼B

1.3. PRINĊIPJUTAL-METODU TA' PROVA

Daphnia femminili żagħżugħa (l-annimal ġenitur), li għandhom eta' ta' inqas minn 24 siegħa fil-bidu tal-prova, huma esposti għas-sustanza taħt prova kif miżjuda ma' l-ilma f'limitu ta' konċentrazzjonijiet. It-tul tal-prova huwa ta' 21 ġurnata. Fl-aħħar tal-prova, in-numru totali ta' wild ħajj pprodott minn kull annimal ħajj ikun assessjat. Dan ifisser illi l-prodotti ġovanili mill-adulti li jmutu waqt il-prova huma esklużi mill-kalkulazzjonijiet. Il-prodott tar-riproduzzjoni tal-annimali ġenituri tista' tkun espressa permezz ta' mogħdi oħra (eż. numru ta' wild ħajj prodott minn kull annimal kull ġurnata mill-ewwel ġurnata minn meta l-wild ikun osservat) imma dawn għandhom ikunu rrapurtati flimkien man-numru totali tal-prodotti ġovanili minn kull ġenitur ħajj fl-aħħar tal-prova. Il-prodott tar-riproduzzjoni tal-annimali esposti għas-sustanza taħt prova hija kkomparata ma' dak tal-kontroll (i) sabiex ikun jistaż jiġi stabbilit l-inqas effett ta' konċentrazzjoni osservat (LOEC) u wara stabbilit ukoll dik il-konċentrazzjoni illi li ma kinitx osservata (NOEC). Flimkien ma' dan, u kemm jista' jkun possibbli, id-*data* hija analizzata bl-użu tal-mudell ta' rigressjoni sabiex tkun tista' tkun stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża riduzzjoni ta' x % fil-prodott riproduttiv (i.e. the EC_{50}, EC_{20}, jew EC_{10}).

Is-sovravivenza tal-annimali ġenituri u l-ħin sal-produzzjoni tal-ewwel grupp għandhu jkun irrapurtat. Effetti oħra rrelatati mas-sustanza fuq il-parametri bħall-kobor (eż. it-tul) u possibilment irrata intrinsika tat-tkabbir, tista' wkoll tkun eżaminata.

1.4. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAĦ TPROVA

Riżultati tat-test ta' tossiċita akuta (ara metodu C.2, Parti I) magħmula minn *Daphnia magna* għandha tkun disponibbli. Irriżultat jista' jkun ta' użu fis-selezzjoni ta' limiti xierqa ta' konċentrazzjonijiet taħt prova fit-test tar-riproduzzjoni. Is-solubilita fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza taħt prova għandhom ikunu magħrufa u metodu analitiku ta' min wieħed joqgħod fuqu għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet taħt prova b'effiċjenza ta' rkuprament rrapurtat u l-limiti ta' determinazzjoni għandhom ikunu disponibbli.

Informazzjoni dwar is-sustanza taħt prova li tista' tkun ta' użu sabiex ikunu stabbiliti l-kondizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula ta' struttura, il-purita' tas-sustanza, stabbilità fid-dawl, stabbilità taħt il-kondizzjonijiet tat-test, pKa, P_{ow} u riżultati tat-test għall-biodegradabilità li diħa kien hemm (ara metodu C.4).

1.5. VALIDITÀ TAL-PROVA

Sabiex il-prova tkun valida dawn il-kriterji ta' esekuzzjoni li ġejjin, għandhom ikunu milħuqa fil-kontroll(i):

— il-mortalità tal-annimal ġenitur (Daphnia femminili) ma taqbiżx l-20 % fl-aħħar tal-prova,

— in-numru medju ta' wild ħaj prodott għal kull ġenitur li jissupera l-prova huwa ≥ 60.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' PROVA

1.6.1. **Apparat**

Vessili ta' prova u apparat ieħor li jkun se jiġi f'kuntatt mas-soluzzjonijiet taħt prova għandhom ikunu magħmula interament mill-ħġieġ u kimiċi oħra magħmula minn materjal inert. Il-vessili tal-prova normalment ikunu beakers tal-ħġieġ.

Flimkien ma' dan, xi wħud jew l-apparat kollu li ġej se huwa bżonnjuż:

— meter tal-ossiġenu (b'microelectrode jew apparat aktar xieraq għall-kejl ta' ossiġenu li kien maħlul f'kampjun ta' volum baxx),

▼B

— apparatat adekwat għall-kontroll tat-temperatura,

— pH meter,

— apparat għad-determinazzjoni tat-toqol ta' l-ilma,

— apparat għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-karbon organiku totali (TOC) ta' l-ilma jew apparat għad-determinazzjoni tad-domanda tal-ossiġenu kemikali (COD),

— pparat adegwat għall-kontroll fuq utenti tar-reġim tad-dawl u l-kejl tal-intesita' tad-dawl.

1.6.2. **Organismu taħt prova**

L-ispeċi li għandhom ikunu użati fil-prova huma id-*Daphnia magna* Straus. Speċi ta' *Daphnia* oħra jistgħu jkunu użati sakemm dawn jilħqu l-kriterji ta' validita' kif xieraq (il-kriterju tal-validita' relatat mall-prodott tar-riproduzzjoni fil-kontrolli għandu jkun rilevanti għall-ispeċi ta' *Daphnia*). Jekk speċi oħra ta' *Daphnia* jkunu użati huma għandhom ikunu identifikati kjaramant u jkun ġustifikat l-użu tagħhom.

Preferibillment, il-klon għandu jkun ġie identifikat mill-ġenotipu. Riċerka (1) uriet illi l-prestazzjoni tar-riproduzzjoni ta' Klon A (li oriġina minn IRCHA fi Franza) (3) konsistentament laħaq il-kriterju tal-validita' tal-medju of ≥ 60 wild ħal kull ġenitur annimal li jkun baqa' ħajj meta ġie mkabbar taħt il-kondizzjonijiet deskritti f'dan il-metodu. Madankollu, kloni oħra huma aċċettabbli jekk il-kultura tad-*Daphnia* turi illi laħqet il-kriterju tal-validita' għall-prova.

Fil-bidu tal-prova, l-annimali għandhom ikollhom inqas minn 24 siegħ u ma għandhomx ikunu proġeni tal-ewwel brood. Għandhom ikunu meħuda minn ħażna b'saħħitha (i.e. li ma juru l-ebda sinjal ta' stress bħal mortalitaż għolja, preżenza ta' rġiel u ephippia, ritardjar fil-produzzjoni ta' l-ewwel grupp, annimali diskoloriti eċċ.). L-annimali li jkunu maħżuna għandhom ikunu miżmuma f'kondizzjonijiet ta' kulturi (dawl, temperatura, medium, għalf u annimali għall-kull unit ta' volum) simili għal dawk użati fil-prova. Jekk il-medium tal-kultura ta' *Daphnia* li tkun se tintuża fil-prova hija differenti minn dik użata għall-kultura normali ta' *Daphnia*, hija prattika tajba illi tinkludi pretest ta' perjodu ta' akklimazzjoni li normalment tieħu tliet ġimgħat (i.e. ġenerazzjoni waħda) sabiex jkun evitat illi jikkawża stress fuq l-annimali ġenituri.

1.6.3. **Medium taħt prova**

Huwa rrikmandat illi medium li huwa kompletament definit huwa użat għall-prova. B'hekk ikun qiegħed jiġi evitat l-użu ta' addittivi (eż. alġi, estratt tal-ħamrija, eċċ.), li huma diffikultuži biex jiġu karatterizzati, u għalhekk jirranġa l-opportunitajiet għall-istandarizzar bejn il-laboratoji. Elendt ta' media M4 (4) u M7 (ara l-Anness 1) instabu illi huma adegwati għal dan il-għan. Madankollu, media oħra (eż. (5) (6)) huma aċċettabbli kemm-il darba l-prestazzjoni tal-kultura ta' *Daphnia* turi illi tilħaq il-kriteju tal-validita' għall-prova.

Jekk media huma użati li jinkludu addittivi li mhumiex definiti, dawn l-addittivi għandhom ikunu speċifikati kjarament u l-informazzjoni għandha tkun ipprovduta fir-rapport tat-test dwar il-komposizzjoni, partikolarment fejn tikkonċerna l-kontenut ta' karbon għaliex dan jista' jikkontribwixxi għad-dieta kif previst. Huwa rikomandit illi il-carbon organiku totali (TOC) u/jew id-domanda ta' ossiġenu kemikali (COD) tal-preparazzjoni tal-ħażna tal-addittiv organiku huwa determinat u jkun magħmul estimu tal-kontribuzzjoni distributorja tal-TOC/COD fil-medium taħt prova. Huwa rikomandit illi l-livelli ta' TOC fil-medium (i.e. qabel l-addizzjoni tal-algi) jkunu taħt il-2 mg/l (7).

▼B

Meta jkunu qegħdin jiġu ttestjati sustanzi illi fihom hemm il-metalli, huwa importanti illi wieħed jirrikonoxxi illi l-kwalitajiet tal-medium taħt prova (eż. toqol, kapaċita' ta' kilatar) jistgħu jkollhom impatt fuq it-tossiċita tas-sustanza taħt prova. Għal din ir-raġuni, huwa meħtieġ medium illi huwa kompletament definit. Madankollu, fil-preżent, l-unika medium illi huwa definit kompletament li huwa magħruf illi huwa adegwat għall-kultura ta' *Daphne* fuq medda twila ta' żmien huma l-Elendt M4 u M7. Iż-żewġ media fihom s-sustanza kilata EDTA. Ix-xogħol wera (2) illi t-"tossiċita apparenti" tal-cadmium hija ġeneralment inqas meta t-test tar-riproduzzjoni kien magħmul f'media ta' M4 u M7 milli meta kienu f'media li ma kienx fihom EDTA. M4 u M7 mhumiex, għalhekk, irrikmandati għat-testjar ta' sustanzi illi fihom il-metalli, u media oħra illi hu magħruf illi fihom sustanzi kilati għandhom ikunu evitati. Wieħed jista' jkun ta' parir ilii għal sustanzi li fihom il-metall ikun użat medium alternattiv bhal, per eżempju, ASTM rikonstitwit f'ilma frisk aħrax (7), li fihom ma jkunx hemm EDTA, u li jkollhom magħhom estratti ta' alġi (8). Din il-kombinazzjoni ta' ASTM rikonstitwit f'ilma frisk aħrax u estratt ta' alġi huwa wkoll adegwat għal kulturi għal żmien twil u ttestjar ta' magna ta' *Daphne* (2), għalkemm xorta joħroġ azzjoni kilanti medja dovuta minħabba l-komponent organiku tal-estratt ta' alġi li ġew mgħaduda.

Fil-bidu u waqt il-prova, l-l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu li ġie maħlul għandu jkun 'il fuq minn 3 mg/l. Il-pH għandha tkun bejn 6-9, u normalment m'għandhiex tvarja aktar minn 1,5 units f'test wieħed. Ħruxija 'il fuq minn 140 mg/l (bħal $CaCO_3$) huwa rikomandat. Testijiet f'dan il-livell u 'il fuq minnhom urew prestazzjoni ripproduttiva flimkien mall-kriteju ta' validita' (9) (10).

1.6.4. **Soluzzjonijiet taħt prova**

Soluzzjonijiet taħt prova ta' konċentrazzjonijiet magħżula huma ġeneralment ippreparati billi jkun hemm taħlita ta' ilma mas-soluzzjoni maħżuna. Soluzzjonijiet maħżuna huma preferibilment ippreparati billi jkun hemm taħlita ta' ilma mas-soluzzjoni fil-medium taħt prova.

L-użu ta' solventi organiċi jew dispersanti jistgħu jkunu meħtieġa f'ċerti każijiet sabiex ikun hemm produzzjoni ta' ħażna ta' soluzzjoni konċentrata xierqa, imma għandu jsir hemm kwalsiasi sforz meħtieġ sabiex jiġi evitat l-użu ta' dawn il-materjali. Eżempji ta' solventi xierqa huma acetone, ethanol, methanol, dimethylformamide u triethylene glycol. Eżempji ta' dispersanti xierqa huma Cremophor RH40, methylcellulose 0,01 % u HCO-40. Fi kwalsiasi każ, is-sustanzi taħt prova għandhom ma jaqbżux il-limiti ta' solubilità tal-medium taħt prova.

Is-solventi huma użati sabiex jipproduċu ħażna ta' soluzzjoni li tista' tkun mħallta preċiżament mal-ilma. Fil-medium taħt prova finali, il-konċentrazzjoni tas-solvent rikomandita (i.e. ≤ 0,1 ml/l), is-solventi imniżżlin hawn fuq m'għandhomx ikunu tossiċi u m'għandhomx iżidu is-solubilita' ta' sustanza.

Dispersanti jistgħu jassistu f'taħlit preċiż u disperzjoni. Fil-medium taħt prova finali, il-konċentrazzjoni tas-solvent rikomandita (≤ 0,1 ml/l), id-dispersanti imniżżlin hawn fuq m'għandhomx ikunu tossiċi u m'għandhomx iżidu is-solubilita' ta' sustanza.

▼B

1.7. DISINN TAĦ TPROVA

It-trattamenti għandhom ikunu allokati għall-vessili tat-test u kull immaneġġjar sussegwenti tal-vessili tat-test għandhu jkun magħmul f'mod każwali. Fin-nuqqas li jsir dan jista' jirriżulta fi żbilanċ illi jista' jittieħed bħala effett ta' konċentrazzjoni. Partikolarment, jekk units esperimentali huma immaniġjati f'ordni ta' trattament jew taż konċentrazzjoni, jiġri illi xi effett relatat mall-ħin, bħal għeja tal-operatur jew xi żball ieħor, jista' jwassal għall-effetti akbar f'konċentrazzjonijiet akbar. Barra minnhekk, jekk ir-riżultati tat-test probabbli illi jkunu affettwati b'ambjent li jkun fih inizjalment jew bil-kondizzjoni ambjentali tal-prova, bħal posizzjoni fil-laboratorju, hemmhekk mela għandu jittieħed in konsiderazzjoni sabiex il-prova tkun imblukkata.

1.8. PROĊEDURA

1.8.1. **Kondizzjonijiet ta' espożizzjoni**

1.8.1.1. *Tul ta' żmien*

Id-durazzjoni tat-test hija ta' 21 ġurnata.

1.8.1.2. *Tgħabija*

Annimali ġenituri huma mantenuti individwalment, wieħed għal kull vessilu ta' prova, b'50-100 ml ta' medium f'kull vessilu.

Volumi akbar jistgħu xi kultant ikun neċessarji sabiex jilħqu ir-rekwiżiti tal-proċedura analitika użata sabiex tkun determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanza taħt prova, għalkemm il-pooling ta' repliki għall-analiżi kemikali hija wkoll aċċettabbli. Jekk jintużaw volumi akbar minn 100 ml, ir-ratio mogħti lid-*Daphnia* jista' jkollu bżonn illi jiżdied sabiex ikun assigurat illi jkun hemm provista adegwata ta' ikel u konformita mall-kriterju tal-validita'. Għal testijiet ta' flow-through, disinji alternattivi jistgħu jiġu kkunsidrati għal raġunijiet ta' teknika, (e.ż. erba' gruppi ta' 10 annimali f'volum akbar ta' prova), imma kwalsiasi kambjament għandu jkun irrapurtat.

1.8.1.3. *Numru ta' annimali*

Għall-testijiet semi-statiċi, mill-inqas 10 annimali miżmuma individwalment f'kull konċentrazzjoni ta' prova u mill-inqas 10 annimali miżmuma individwalment f'serje ta' kontrolli.

Għal testijiet ta' flow-through, 40 annimal maqsuma f'erba gruppi ta' għaxar annimali għal kull konċentrazzjoni taħt prova ġie muri li jkunu adegwati (1). Numru iżgħar ta' organiżmi taħt prova jistgħu jkunu użati u minimu ta' 20 annimali għal kull konċentrazzjoni maqsuma f'żewg repliki jew aktar b'numru indaqs ta' annimali (e.ż. erba' repliki kull wieħed b' ħames daphnids) huma rakomandati. Għandu jkun innutat illi għall-testijiet fejn l-annimali huma miżmuma fi gruppi, mhux se jkun possibbli illi jiġi espress r-riżultat ripproduttiv bħala numru totali ta' wild ħajjin prodotti għal kull annimal ġenitur ħajj fl-aħħar tal-prova, jekk l-annimal ġenitur imut. F'dawn il-każijiet il-produzzjoni ripproduttiva għandha tkun espressa bħala "in-numru totali ta' offspring ħajjin prodotti għal kull ġenitur prezenti fil-bidu tal-prova".

1.8.1.4. *Għalf*

Għal testijiet semi statiċi, l-għalf għandu preferibbilment ikun magħmul kulljum, iżda mill-inqas tlett darbiet fil-ġimgħa (i.e. li jikkorrispondi mal-kambjamenti fil-media). Devjazzjonijiet minn dan (e.ż. għat-testijiet ta' flow-through) għandu jkun irrapurtat.

▼B

Waqt il-prova, id-dieta tal-annimal ġenitur għandha preferibbilment tkun ċelloli ta' algi ħajjin ta' wieħed jew aktar minn dawn li ġejjin: *Chlorella sp., Selenastrum capricornutum* (issa *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) u *Scenedesmus subspicatus*. Id-dieta mogħtija għandha tkun ibbażata fuq l-ammont ta' karbon organiku (C) previst f'kull annimal ġenitur. Riċerka (12) write illi, għall-*Daphnia magna*, livelli ta' razzjon bejn 0,1 u 0,2 mg C/*Daphnia*/kull ġurnata huma biżżejjed sabiex jintlaħaq in-numru rikjest ta' wild sabiex jintlaħaq il-kriteju tal-validita'. Ir-razzjoni jista' jkun mogħti jew f'rata konsistenti matul il-perjodu ta' prova, jew, jekk mixtieq, rata aktar baxxa tista' tkun użata fil-bidu u mbagħad tkun miżjuda waqt il-prova sabiex jittieħed in konsiderazzjoni l-kobor tal-annimal ġenitur. F'dan il-każ, ir-razzjon għandu xorta jibqa' fil-limitu rakomandit ta' 0,1 - 0,2 mg C/*Daphnia*/kuljum fi kwalsiasi ħin.

Jekk miżuri surrogati, bħan-numru ta' ċelloli ta' algi jew l-assorbiment tad-dawl, huma użati sabiex jiġu mitmugħa il-livelli rikjesti tar-razzjon (i.e. għall-konvenjenza minħabba il-kejl tal-kontenut ta' karbon jieħu l-ħin), kull laboratorju għandu jipproduċi n-nomograff propju relatat mal-miżura ta' surroga tal-kontenut ta' karbon fil-kulturi ta' algi (ara l-anness 2 għal pariri dwar il-produzzjoni ta' nomograff). Nomograffs għandhom ikunu iċċekkjati mill-inqas kull sena jew aktar jekk il-kondizzjonijiet tal-kultura ta' l-algi jinbidlu. Ġie misjub illi l-assorbiment tad-dawl huwa surroga aħjar għall-kontenut ta' karbon minn numru ta' ċelloli (13).

Suspension ikkonċentrata ta' algi għandhom ikunu mitmugħa lid-*Daphnia* sabiex jitnaqqas il-volum ta' medium ta' kultura ta' algi trasferita fil-vessili ta' prova. Konċentrazzjoni ta' algi tista' tkun milħuqa b'centrifugazzjoni u wara b' resuspension f'ilma ddistillat, ilma deionizzat medium ta' kultura ta' *Daphnia.*

1.8.1.5. *Dawl*

16–il siegħa dawl f'intensità li ma taqbiżx il-15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

1.8.1.6. *Temperatura*

It-temperatura tal-media taħt prova għandha tkun fir-range ta' 18-22 °C. Madankollu, għal kull prova, it-temperatura m'għandhiex tvarja, kemm jista' jkun possibbli, b'aktar minn 2 °C bejn dawn il-limiti (e.ż. 18-20, 19-21 jew 20-22 °C). Jista' ikun xieraq illi jintuża vesseli ta' prova ieħor sabiex it-temperatura tkun tista' tiġi kkontrollata.

1.8.1.7. *Aeration*

Il-vessili ta' prova m'għandhomx ikunu aerated waqt il-prova.

1.8.2. **Konċentrazzjoni tal-prova**

Normalment, għandu jkun hemm mill-inqas ħames konċentrazzjonijiet tal-prova impoġġijja f'serje ġeometrika b'fattur ta' separazzjoni preferibilment li ma jeċċedix 3.2, u n-numru xieraq tar-repliki għal kull konċentrazzjoni tal-prova għandhom ikunu użati (ara taqsima 1.8.1.3). Ġustifikazzjoni għandha tkun ipprovduta jekk inqas minn ħames konċentrazzjonijiet ikunu użati. Is-sustanzi m'għandhomx ikunu ittestjati 'il fuq mill-limitu tas-solubilita' tagħhom fil-medium tat-test.

▼B

Sabiex ikun stabbilit limitu tal-konċentrazzjonijiet, wieħed ma jridx jinsa dawn li ġejjin:

(i) Jekk l-għan ikun illi jinkiseb LOEC/NOEC, l-inqas konċentrazzjoni ta' prova għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex il-fekundita f'dik il-konċentrazzjoni mhijiex konsiderevolment aktar baxxa minn dik tal-kontroll. Jekk dan mhuwiex il-każ, it-test għandu jkun ripetut b'inqas konċentrazzjoni mnaqqsa;

(ii) Jekk l-għan ikun illi jinkiseb LOEC/NOEC, l-ogħla konċentrazzjoni ta' prova għandha tkun għolja biżżejjed sabiex il-fekundita f'dik il-konċentrazzjoni hija konsiderevolment aktar baxxa minn dik tal-kontroll. Jekk dan mhuwiex il-każ, it-test għandu jkun ripetut bl-ogħla konċentrazzjoni miżjuda;

(iii) Jekk il-EC_X għall-effetti fuq ir-riproduzzjoni hija estimata, wieħed huwa ta' parir illi jkunu użati konċentrazzjonijiet biżżejjed sabiex jagħtu definizzjoni lill-EC_X b'livell xieraq ta' kunfidenza. Jekk il-EC_{50} għall-effetti fuq ir-riproduzzjoni hija estimata, wieħed huwa ta' parir illi l-ogħla konċentrazzjoni taħt prova tkun akbar minn din il-EC_{50}. Inkella, għalkemm wieħed xorta jkun jista' jagħti estimu għall-EC5O, l-interval ta' kunfidenza għall-EC_{50} tkun wiesgħa ħafna u jista' ma jkunx possibbli illi ikun stima sodifaċenti jekk il-mudell kif magħmul kienx xieraq;

(iv) Il-limitu tal-konċentrazzjoni tat-test għandu preferibilment ma jinkludix xi konċentrazzjonijiet illi għandhom effett statistikament sinjifikattiv fuq is-sovravivenza tal-adult billi dan ibiddel in-natura tat-test minn sempliċiment test ta' riproduzzjoni għall-riproduzzjoni kkombinata u test tal-mortalita li jirrikjedu aktar analizzar kumpless statistikament.

Informazzjoni minn qabel tat-tossiċita' tas-sustanza taħt prova (e.ż. minn prova akuta u/jew studji sabiex jinstabu il-limiti) għandhom jgħinu fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet l-aktar xierqa għall-prova.

Fejn solvent jew dispersant huwa użat sabiex jgħin fil-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-prova (ara taqsima 1.6.4), il-konċentrazzjoni finali tagħha fil-vessili tal-prova għandhom ikunu akbar minn 0,1 ml/l u għandhom ikunu l-istess bħal tal-vessili tal-prova.

1.8.3. **Kontrolli**

Serje ta' medium ta' prova wieħed u jekk rilevanti serje ta' kontroll wieħed li fih solvent jew dispersant għandu jiġi magħmul ukoll ukoll għas-serje tat-test. Meta użat, il-konċentrazzjoni tas-solvent jew tad-dispersant għandha tkun l-istess bħal dik użata fil-vessili illi fihom ikunu jinsabu is-sustanzi taħt prova. In-numru xieraq ta' repliki għandhom jkun użat (ara taqsima 1.8.1.3).

Ġeneralment, fi prova magħmula tajba, il-koeffiċjent tal-varjazzjoni madwar in-numru medju tal-wild ħajjin prodotti għal kull annimal ġenitur fil-kontroll(i) għandu jkun ta' $\leq$ 25 %, u dan għandu jkun irrapurtat għad-disinni tat-test bl-użu tal-annimali użati individwalment.

1.8.4. **Rinovazzjoni tal-medium tat-test**

Il-frekwenza tar-rinovazzjoni tal-medium jiddependi fuq l-istabbilita tas-sustanza taħt prova, imma għandha tkun mill-inqas ta' tlett darbiet fil-ġimgħa. Jekk, mill-prova preliminarja sabiex tkun tista' tiġi stabbilita, (ara taqsima 1.4) il-konċentrazzjoni tas-sustanza taħt prova mhijiex stabbli (i.e. barra l-limitu 80-120 % tan-nominali jew li taqa' taħt it-80 % tal-konċentrazzjoni kif imkejla fil-bidu) fuq perjodu ta' rinovazzjoni massimu (i.e. tlett ijiem), wieħed għandu jieħu in konsiderazzjoni ir-rinovazzjoni aktar frekwenti, jew għall-użu ta' test flow-through.

▼B

Meta il-medium huwa rinovat fi prova semi-statika, it-tieni serje ta' vessili tal-prova għandhom ikunu ppreparati u l-annimali ġenitur jiġu ttrasferiti fihom, b'pipetta tal-ħġieġ per eżempju li jkollha diametru xieraq. Il-volum ta' medium trasferit bid-Daphnia għandu jkun minimizzat.

1.8.5. **Osservazzjonijiet**

Ir-riżultati tal-osservazzjonijiet magħmula waqt il-prova għandhom ikunu rreġistrati fuq data sheets (ara eżempji fl-Appendiċi 3 u 4). Jekk miżuri oħra huma bżonnjużi (ara 1.3 u 1.8.8) osservazzjonijiet addizzjonali jistgħu jkunu meħtieġa.

1.8.6. **Wild**

Il-wild li huma prodotti minn kull annimal ġenitur għandu preferibilment ikun imneħħi u jingħadd kuljum sad-dehra ta' l-ewwel grupp, sabiex tipprevenihom milli jikkunsmaw ikel li jkun intiż għall-adulti. Għal dan il-metodu huwa biss in-numru ta' wild ħajj li hemm bżonn illi jiġu mgħaduda, iżda l-preżenza ta' bajd abbortit u ta' wild mejjet għandu jkun irrekordjat.

1.8.7. **Mortalità**

Mortalità fl-annimali ġenituri għandha tkun irrekordjata preferibilment kuljum, mill-inqas fl-istess ħinijiet illi l-wild huma magħduda.

1.8.8. **Parametri oħra**

Għalkemm dan il-metodu huwa intiż prinċiparjament sabiex ikun hemm stima fuq ir-riproduzzjoni, huwa possibbli illi effetti oħra jistgħu jkunu kkwantifikati biżżejjed li jippermettu analiżi statika. Kejl ta' kobor huwa desiderevoli ħafna minħabba illi jipprovdi informazzjoni fuq effetti li possibilment jistgħu jkunu subletali, li jistgħu jkunu aktar ta' użu mill-kejl tar-riproduzzjoni waħedha; il-kejl tat-tul tal-annimali ġenituri (i.e. it-tul tal-ġisem minbarra l-ispina anali) fl-aħħar tal-prova huwa rrakomandit. Parametri oħra li jistgħu jiġu mkejla jew ikkalkolati jinkludu ż-żmien illi jieħdu sabiex jipproduċu l-ewwel grupp (u gruppi oħra), numbru u miżura tal-gruppi għal kull annimal, numru ta' gruppi abbortiti, preżenza ta' rġiel jew ephippia u r-rata intrinsika taż-żieda fil-popolazzjoni

1.8.9. **Il-frekwenza tad-determinazzjonijiet analitiċi u l-kejl**

Konċentrazzjoni ta' ossiġenu, temperatura, ħruxija u l-valuri tal-pH għandhom ikunu mkejla mill-inqas darba fil-ġimgħa, fil-kontroll(i) u fl-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza taħt prova.

Waqt il-prova, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza taħt prova huma ddeterminati f'intervalli regolari.

F'testijiet semi-statiċi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza taħt prova hija maġsuba illi tibqa' bejn ± 20 % tan-nominali (i.e. fil-limitu 80-120 % – ara 1.4 u 1.8.4), huwa rrakomandit illi, bħala minimu, l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-testijiet huma analiżżati meta jkunu ppreparati ġodda u fil-ħin tar-rinovazzjoni f'okkażjoni ta' darba waqt l-ewwel ġimgħa tal-prova (i.e. l-analiżi għandhom ikunu magħmula fuq kampjun ta' l-istess soluzzjoni – meta tkun għadha kemm ġiet ippreparata u meta rrinovata). Dawn id-determinazzjonijiet għandhom ikunu irripetuti mill-inqas f'intervalli ta' ġimgħa u ta' ġimgħa wara ġimgħa wara dan.

▼B

Għal provi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza taħt prova mhijiiex maħsuba illi tibqa' fil-limiti ± 20 % tan-nominali, huwa neċessarju illi ssir analiżi tal-konċentrazzjonijiet tal-prova, meta ppreparata mill-bidu jew meta rrinovatai. Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza taħt prova mhijiex fil-± 20 % tan-nominali imma jista' jkun hemm evidenza biżżejjed illi turi illi l-konċentrazzjonijiet tal-bidu huma repetibbli u stabbli (i.e. fil-limitu ta' 80-120 % tal-konċentrazzjonijiet tal-bidu), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jkunu mnaqqsa b' 2 ġimgħat u 3 tat-test sa l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tal-prova. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza taħt prova qabel ikunu rrinovati tista' tiġi magħmula f'vessilu wieħed ta' replika f'kull konċentrazzjoni taħt prova.

Jekk prova ta' flow-through hija użata, reġim ta' teħid ta' kampjuni simili għal dak deskritt fil-prova semi statika huwa xieraq (iżda l-kejl tas-soluzzjonijeit "qodma" mhuwiex applikabbli f'dan il-każ). Madankollu, wieħed jista' jkun ta' parir illi jiżdiedu n-numri ta' okkażżjonijiet ta' teħid ta' kampjuni waqt l-ewwel ġimgħa (e.ż. tlett gruppi ta' kejl) sabiex ikun assigurat illi l-konċentrazzjonijiet tal-prova għadhom stabbli. F'dawn it-tipi ta' testijiet, ir-rata tal-flow tad-diluent u s-sustanza taħt prova huma iċċejkati kuljum.

Jekk ikun hemm evidenza illi l-konċentrazzjoni tas-sustanza li tkun qegħda tiġi ttestjata kienet ikkontrollata kif xieraq fl-± 20 % tan-nominali jew fil-konċentrazzjoni imkejla fil-bidu baqghet l-istess waqt it-test, mela r-riżultati jistgħu jkunu ibbażati fuq in-nominali u fuq il-valuri tal-bidu kif imkejla. Jekk id-devjazzjoni minn nominali jew mill-valuri tal-bidu kif imkejla hija akbar minn ± 20 %, ir-riżultati għandhom ikunu espressi ai termini tal-medju kif imkejjel skond il-ġin.(ara l-anness 5).

2. *DATA* U RAPURTAĠĠ

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

L-għan ta' din il-prova huwa illi jkun stabbilit l-effett tas-sustanza taħt prova fuq in-numru totali ta' wild ħaj prodott għal kull annimal ġenitur li huwa ħajj fl-aħħar tal-prova. In-numru totali tal-wild għal kull annimal ġenitur għandu jkun ikkalkolat għall-kull vessilu ta' prova (i.e. repliki). Jekk, fi kwalsiasi replika l-annimal ġenitur imut waqt il-prova jew jiġri illi jkun maskili, mela r-replika hija eskluża mill-analiżi. L-analiżi mbagħad tkun ibbażata fuq in-numru ridott ta' repliki.

Sabiex tkun stmata l-LOEC, u wara l-NOEC, għall-effetti tal-kimiċi fuq il-prodott tar-riproduzzjoni, huwa neċessarju illi jkun ikkalkolat l-prodott mean tar-riproduzzjoni tul repliki għal kull konċentrazzjoni u d-devjazzjoni standard residwali kif miġmuha, u din tista' tkun magħmula bl-użu tal-analiżi tal-varjant (ANOVA). Il-medju għal kull konċentrazzjoni għandu mbagħad ikun ikkomparat mall-medju ta' kontroll bl-użu ta' metodu ta' ikkomparar multipliku kif ikun xieraq. It-test ta' Dunnett jew ta' Williams jista' jkun ta' użu (14) (15) (16) (17). Huwa neċessarju illi wieħed jiċċekkja jekk l-assumazzjoni ANOVA tal-homogeneity tal-varjant huwiex validu. Huwa rrikomandit illi dan huwa magħmul graffikament, iktar milli bl-użu ta' prova sinjifikattivi formali (18); alternattiv xieraq sabiex jiġi magħmul it-test ta' Bartlett. Jekk din l-assumazzjoni ma treġix, hemmhekk wieħed għandu jikkonsidra illi d-data tkun ittrasformata sabiex tkun omoġinezzata il-varjanza qabel issir l-ANOVA, jew qabel issir ANOVA ta' ċertu saħħa. Il-kobor tal-effett kif dedott bl-użu tal-ANOVA (i.e. id-differenza l-inqas sinjifikanti) għandu jkun ikkalkolat u rrapurtat.

▼B

Għall-estimu tal-konċentrazzjoni illi jista' jikkawża riduzzjoni ta' 50 % fil-prodott riproduttiv (i.e. l- EC_{50}), kurvatura xierqa, bħall-kurvatura loġistika, għandha tkun xierqa għad-data bl-użu ta' metodu ta' statistika bħal l-inqas kwadri. Il-kurvatura tista' tkun parametrizzata sabiex il- EC_{50} u l-iżbalji standard tagħha jistgħu jiġu estimati direttament. Dan jgħin ħafna fil-kalkulazzjoni tal-limiti ta' kunfidenza tal-EC5O. Kemm-il darba ikun hemm raġuni validi għal xiex jintużaw livelli ta' kunfidenza differenti, 95 % tal-limiti ta' kunfidenza ta' żewġ naħat għandhom ikunu kkwotati. Il-proċedura xierqa għandha preferibbilment tipprovdi mezz ta' kif wieħed jagħmel stima tal-mankanza xierqa. Dan jista' jkun magħmul graffikament jew bid-diviżjoni tas-somma li tibqa' ta' kwadri fil-"lack of fit" u "pure error components" u li jagħmlu test sinjifikattiv tal-mankanza xierqa. Billi trattamenti illi jagħtu fekundita' għolja aktarx li għandhom varjanza għola fin-numru ta' prodotti ġovanili aktar mit-trattamenti li jaħtu fekundita' baxxa, wieħed għandu jagħti konsiderazzjoni lill-valuri osservati sabiex jirreflettu l-varjanzi differenti fi gruppi ta' trattament differeneti (ara bħala riferenza l-informazzjoni fl-isfond (18).

Fl-analiżi tad-data mill-aħħar dawra ta' prova (2), kurvatura loġistika kienet magħmula permezz taż l-użu tal-mudell kif ġejj, għalkemm mudelli oħra kkonsidrati bħala xierqa jistgħu jkunu użati:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

fejn:

Y = in-numru totali ta' ġovanili għal kull annimal ġenitur ħajj fl-aħħar tal-prova (ikkalkolat għal kull vessilu)

x = il-konċentrazzjoni tas-sustanza

c = in-numru pretiż ta' ġovanili meta x = 0

x_0 = il EC_{50} fil-popolazzjoni

b = il-parametru tan-niżla.

Dan il-mudell huwa x'aktarx adegwat f'numru kbir ta' sitwazzjonijiet, imma jista' jkun hemm provi fejn mhuwiex adegwat. Għandu jkun hemm ispezzjoni dwar il-validita' tal-mudell kif issuġġerit hawn fuq. F'xi każijiet, mudell ta' hormesis li jagħti konċentrazzjonijiet baxxi jista' jkun xieraq (19).

Konċentrazzjonijiet oħra ta' effett, bħal EC_{10} jew EC_{20} jistgħu wkoll ikunu stmati, għalkemm ikun aktar preferibbli illi tintuża parametrizzazzjoni differenti tal-mudell minn dak uzat sabiex tkun stmata l-EC_{50}.

2.2. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

2.2.1. **Sustanza taħt prova:**

— natura fiżika u kwalitajiet psikokemikali,

▼B

— *data* ta' identifikazzjoni ta' kimiċi, inkluż il-purita'.

2.2.2. **Speċi tal-prova:**

— il-klon (jekk kienx tipati ġenetikament, il-fornitur jew l-egħjun (jekk hu magħruf) u l-kondizzjonijiet tal-kultura użati. Jekk speċi differenti ta' *Daphnia* magna hija użata, din għandha tkun irrapurtata u ġġustifikata.

2.2.3. **Kondizzjonijiet ta' prova:**

— Proċedura ta' prova użata (e.ż. semi-statika jew flow-through, volum, tgħabija fin-numru ta' *Daphnia* għal kull litru),

— photoperiod u intensita' ta' dawl,

— disinn tal-prova (e.ż. numru ta' repliki, numru ta' ġenituri għal kull replika),

— dettalji tal-medium tal-kultura użat,

— jekk użati, addizzjonijiet ta' materjali organiċi inkluż il-komposizzjoni, egħjun, metodu tal-preparazzjoni, TOC/COD tal-preparazzjonijiet tal-ħażniet, estimu tal-TOC/COD kif riżultanti fil-medium tal-prova,

— informazzjoni dettaljata dwar għalf, inkluż ammont (f'mg C/-*Daphnia*/kull ġurnata) u skeda (e.ż. tip ta' ikel, inkluż għall-algi b'ismijiet speċifiċi (speċi) u, jekk magħruf, it-tensjoni, il-kondizzjonijiet tal-kultura),

— metodu tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna u l-frekwenza tar-rinovar (is-solvent jew dispersant u l-konċentrazzjoni tagħha għandhom jingħataw, meta użati).

2.2.4. **Riżultati:**

— riżultati minn xi studji preliminari dwar l-istabilita' tas-sustanza taħt prova;

— il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali u r-riżultati tal-analiżi kollha sabiex ikun stabbilit il-konċentrazzjoni tas-sustanza taħt prova fil-vessili tal-prova (ara id- data sheets tal-eżempju fl-anness 4); l-effiċjenza tal-irkuprar tal-metodu u l- limiti tad-determinazzjoni għandhom ikunu irrapurtati wkoll,

— il-kwalità tal-ilma fil-vessili tal-prova (i.e. pH, temperatura u l-konċnetrazzjoni tal-ossiġenu kif inħall, u TOC u/jew COD u ħruxija fejn applikabbli ara id-data sheets tal-eżempju fl-anness 3),

— ekord komplet tal-offspring ħajj minn kull annimal ġenitur (ara d-data sheets tal-eżempju fl-anness 3),

— in-numru ta' mejtin fl-annimali ġenituri u d-data meta tiġri (ara d-data sheets tal-eżempju fl-anness 3),

— il-koeffiċjent tal-varjazzjoni fuq il-fekundita' tal-kontroll (ibbażata fuq in-numru totali tal-wild ħajj għal kull annimal ġenitur ħajj fl-aħħar tal-prova),

— plot tan-numru totali tal-wild ħaj għal kull annimal ġenitur (għal kull replika) fl-aħħar tal-prova vs konċentrazzjoni tas-sustanza taħt prova,

— l-inqas konċentrazzjoni ta' effett osservat (LOEC) għar-riproduzzjoni, inkluż deskrizzjoni tal-proċeduri statistiċi użati u indikazzjoni ta' x' kobor jista' jkollu l-effett u l-konċentrazzjoni mhux osservata ta' effett (NOEC) għar-riproduzzjoni; meta approprjat, l-LOEC/NOEC għall-mortalita' tal-annimal ġenitur għandha wkoll tiġi rrapurtata,

▼B

— meta approprjat, l-ECx għar-riproduzzjoni u l-intervalli ta' kunfidenza u graff tal-mudell kif xieraq użat għall-kalkolazzjoni tagħha, in-niżla tal-kurvitura tad-dose-response u l-Iżball standard tagħha,

— effetti oħra bijoloġiċi osservati jew imkejla: jkun irrapurtat effetti oħra bioloġiċi li kienu ossevati jew mkejla (e.ż. kobor tal-annimali ġenituri) inkluż kwalsiasi ġustifikazzjoni meħtieġa,

— spjegazzjoni ta' xi devjazzjoni mill-metodu tal-prova.

3. **RIFERENZI**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, 257-265.

(4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

(9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 1-8.

(10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053-2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

(14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 510-531.

(18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

(20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs boo

▼B

ANNESS

PREPARAZZJONI TA' ELENDT M7 U M4 MEDIA IMFISSRA KOMPLETAMENT

Akklimazzjoni għal Elendt M7 u M4 media

Xi laboratorji sabu xi diffikultajiet meta trasferixxew direttament id-*Daphnia* għal M4 (1) u M7 media. Madankollu, kien hemm xi suċċess b'akklimazzjoni gradwali, i.e. bilmixi mill-użu tal-medium rikjest għal 30 % Elendt, wara għal 60 % Elendt u mbagħad għal 100 % Elendt. Il-perjodu ta' akklimazzjoni jistgħu jieħdu sa sena.

PREPARAZZJONI

Elementi ta' traċċi

Soluzzjonijiet separati ta' 1–istokk (I) ta' elementi individwali huwa 1–ewwel mitfugħa f'ilma safi, eż. dejonizzat, distillat jew mir-rivers ożmożis. Minn dawn 1–istokkijiet diffrenti (I) soluzzjoni waħdanija (II) tiġi ppreparata, li jkun fiha 1–elementi traċċabbli kollha (is-soluzzjoni kombinata). i.e.

Soluzzjonijiet ta' ħażna I (sustanzi singoli)	Ammont miżjud ma' l-ilma (mg/l)	Konċentr azzjoni (vis-a-vis il-medium M4) (fold)	Sabiex tiġi ppreparata ħażna ta' soluzzjoni II kkombinata żid l-ammont li ġej ta' soluzzjoni I ta' ħażna mal-ilma (ml/l)	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2$ * 4 H_2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ * 6 H_2O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ * 2 H_2O	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ * 6 H_2O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2EDT * 2 H_2O A	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ * 7 H_2O	1 991	2 000	—	—

Kemm is-soluzzjonijiet ta' Na_2EDTA u ta' $FeSO_4$ huma ppreparati singolarment, mferrgħin flimkien u autoklavjata immedjatament. Dan jagħti:

Soluzzjoni ta' 21 Fe-EDTA		1 000-fold	20,0	5,0

▼B

M4 u M7 media

M4 u M7 media huma ppreparati bl-użu ta' soluzzjoni ta' ħażna II, il-macro-nutrijenti u l-vitamini li ġejjin:

	Ammont miżjud ma' l-ilma (mg/l)	Konċentraz zjoni (visa-vis il-medium M4) (fold)	Ammont ta' soluzzjoni ta' ħażna miżjud sabiex ikun ippreparat medium (ml/l)	
			M 4	M 7
Soluzzjoni ta' ħażna II kkombinata ma' oligoelementi		20	50	50
Soluzzjonijiet *macro-nutrient stock* (sustanza waħda)				
$CaCl_2$ * 2 H_2O	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO * 9 $_3$ H_2O	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Combined Vitamin stock	—	10 000	0,1	0,1
Is-soluzzjoni ta' ħażna ta' vitamini kombinati hija ppreprata billi jiżdiedu 3 vitamini ma' 1 litra ilma kif muri hawn taħt:				
Thiamine hydrochloride	750	10 000	—	—
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10 000	—	—
Biotine	7,5	10 000	—	—

Il-ħażna ta' vitamini kombinati hija maħżuna ffriżata f'aliquots żgħar. Vitamini huma miżjuda ftit qabel l-użu.

N.B. Sabiex tkun evitata l-preċipitazzjoni ta' mluħa meta tkun qed tiġi ppreparat l-media kompleta, żid l-aliquots tas-soluzzjonijiet ta' ħażna ma' daqs 500-800 ml ilma dionizzat u wara mlieh sa litru.

N.N.B. L-ewwel pubblikazzjoni ta' M4 medium tista' tinstab f' Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼B

ANNESS 2

ANALIŻI TA' KARBON ORGANIKU (TOC) U TAL-PRODUZZJONI TA' NOMOGRAFF GĦAL KONTENUT TA'TOC FL-IKEL TAL-ALGI

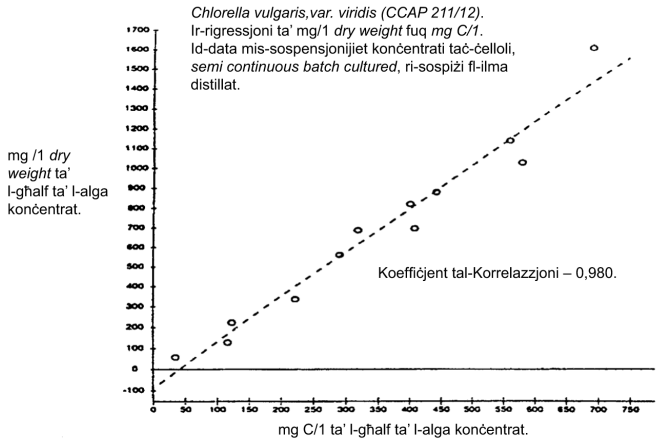
Huwa rikonoxxut illi l-kontenut ta' karbon fl-ikel tal-algi mhuwiex normalment imkejjel direttament iżda minn korrelazzjonijiet (i.e. nomograffi) b'kejl surrogat bġal numru ta' ċelloli ta' algi u assorbiment ta' dawl).

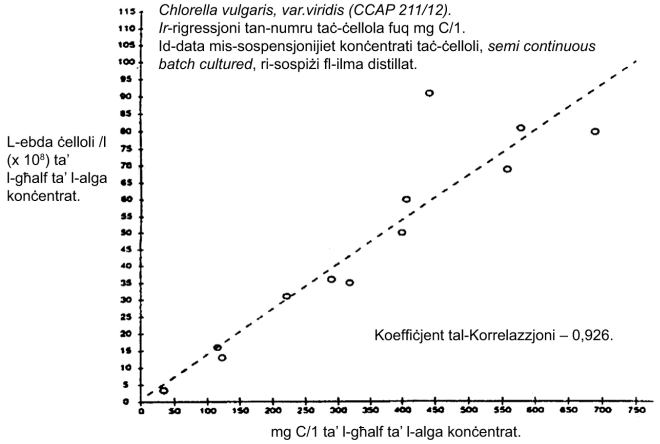
TOC għandu jkun imkejjel b'ossidazzjoni f'temperatura għolja aktar milli bil-UV jew metodi ta' persulphate. (Ara: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Għal produzzjoni ta' nomograff, l-algi għandhom ikumu isseparati mill-medium ta' kobor b'centrifugation u wara b'resuspension f'ilma ddistillat. Kejjel il-parametru ta' surrogate u l-konċentrazzjoni ta' TOC f'kull kampjun tliet darbiet. Blanks ta' ilma ddistillat għandu jkun analizzat u l-konċnetrazzjoni ta' TOC mnaqqas minn dak tal-TOC tal-kampjun tal-algi.

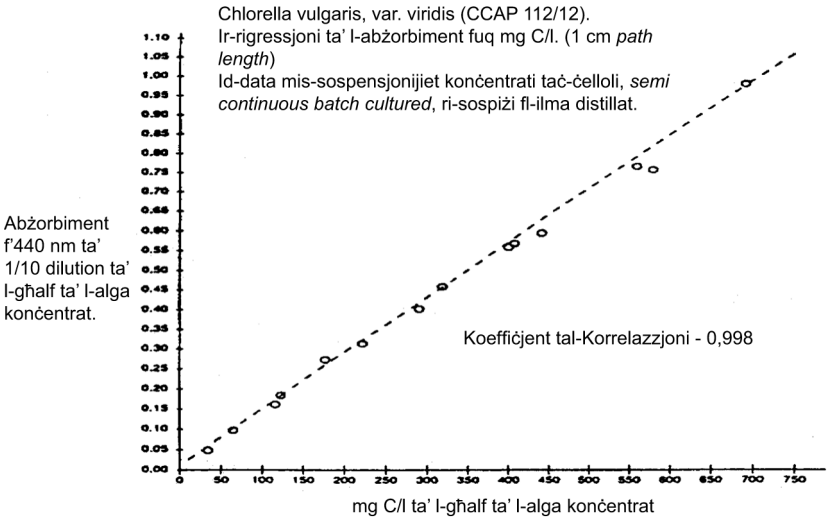
Nomograffi għandu jkun lineari madwar limitu ta' konċetrazzjonijiet ta' karbon. Eżempji huma mhurija hawn isfel.

NB: Dawn ma għandhomx ikunu użati għall-konverżjonijiet; huwa essenzali illi l-laboratorji jippreparaw in-nomografi tagħhom.





▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Ir-rigressjoni ta' l-abżorbiment fuq mg C/l. (1 cm *path length*)
Id-data mis-sospensjonijiet konċentrati taċ-ċelloli, *semi continuous batch cultured*, ri-sospiżi fl-ilma distillat.
Abżorbiment f'440 nm ta' 1/10 dilution ta' l-għalf ta' l-alga konċentrat.
Koeffiċjent tal-Korrelazzjoni - 0,998
1.10
1.05
1.00
0.95
0.90
0.85
0.80
0.75
0.70
0.65
0.60
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
mg C/l ta' l-għalf ta' l-alga konċentrat

▼B

ANNESS 3

EŻEMPJU TA' DATA SHEET LI TIRREĠISTRA RINOVAR TA' MEDIUM, KONTROLL TA' DATA FIŻIKALI/KEMIKALI, IKEL, RIPRODUZZJONI TA' DAPHNIA U MORTALITA FL-ADULTI

Esperiment Nru°:	Data starded:	Clone:	Medium:	Tip ta' ikel:	Sustanza tat-test:	Konk. nominali:

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Tiġdid tal-medium (ittikkja)																								
PH (1)																							ġdid	
																							qadim	
O_2 mg/l (1)																							ġdid	
																							qadim	
Temp (°C) (1)																							ġdid	
																							qadim	
Ikel provdut (ittikkja)																								
In-nru ta' wild ħaj (2)																								T o t a l
Reċipjent 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

2008R0440 — MT — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

Esperiment Nru°:	Data starded:	Clone:	Medium:	Tip ta' ikel:	Sustanza tat-test:	Konk. nominali:

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Total	
Mortalità kumulattiva ta' l-adulti ([3])																								

([1]) Indika liema reċipjent ġie wżat għall-esperiment
([2]) Ir-rekord tal-mortalità ta' kwalunkwe annimal adult bħala "M" fil-kaxxa relevanti
([3]) Ir-rekord ta' *aborted broods* bħala "AB" fil-kaxxa relevanti

▼B

ANNESS 4

EŻEMPJU TA' DATA SHEET GĦAR-REĠISTRAZZJONI TA' RIŻULTATI TA' ANALIŻI KIMIĊI

(a) **Il-konċentrazzjonijiet imkejla**

Konk. nominali	Ġimgħa 1 kampjun		Ġimgħa 2 kampjun		Ġimgħa 3 kampjun	
	Ġdid	Qadim	Ġdid	Qadim	Ġdid	Qadim

(b) **Il-konċentrazzjonijiet imkejla bħala perċentwali tan-nominali**

Konk. nominali	Ġimgħa 1 kampjun		Ġimgħa 2 kampjun		Ġimgħa 3 kampjun	
	Ġdid	Qadim	Ġdid	Qadim	Ġdid	Qadim

▼B

ANNESS 5

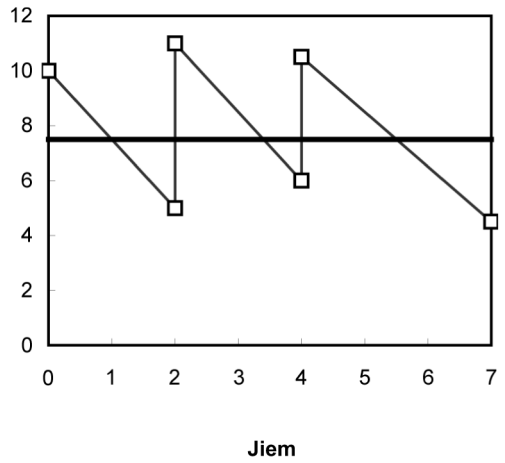
KALKOLU TA' L-INTERMEDJU KKALKULAT MAŻ-ŻMIEN

L-intermedju kkalkulat maż-żmien

Meta wieħed iqis li l-konċentrażżjoni tas-sustanza li qiegħda tiġi eżaminata tista' tonqos tul il-perjodu bejn it-tiġdidiet medji, huwa neċessarju li jiġi kkunsidrat liema konċentrazzjoni għandha tingħażel biex tirrapreżenta s-sensiela ta' konċentrazzjonijiet esperjenzati mill-għajn *Daphnia*. L-għażla għandha tkun ibbażata fuq konsiderazzjonijiet bioloġiċi kif ukoll fuq dawk statistiċi. Per eżempju, jekk huwa maħsub li r-riproduzzjoni hija l-aktar milquta mill-ogħla konċentrażżjoni esperjenzata, allura għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni. Madankollu, jekk l-effett akkumulat jew l-effett fil-futur aktar imbiegħed tas-sustanża tossika huwa kkunsidrat bħala aktar importanti, allura l-konċentrazzjoni medja hija aktar relevanti. F'dan il-każ, ikun approprjat li tintuża l-medja tal-konċentrazzjoni tal-intermedju kkalkulat maż-żmien, peress illi din tikkonsidra l-varjazzjoni fil-konċentrazzjoni instantanja fuq medda ta' żmien.

Figura 1:

Eżempju tal-medja *time-weighted*



Il-figura 1 turi eżempju ta' eżami (semplifikat) li jdum sebat ijiem b'tiġdid medju fil-ġranet 0, 2 u 4.

Il-linja rqiqa f'forma ta' żigżag tirrappreżenta l-konċentrazzjoni waqt kwalunkwe ħin. Wieħed għandu jassumi li l-waqgħa fil-konċentrazzjoni issegwi l-proċess ta' tħassir esponenzali.

Is-sitt punti mmarkati jirrappreżentaw il-konċentrazzjonijiet li ġew osservati imkejla fil-bidu u fit-tmien ta' kull perjodu ta' tiġdid.

Il-linja solida u ħoxna tindika l-posizzjoni ta' l-intermedju kkalkulat maż-żmien.

L-intermedju kkalkulat maż-żmien huwa kkalkulat b'mod li l-erja taħt l-intermedju kkalkulat maż-żmien ikun daqs l-erja taħt il-kurva tal-konċentrazzjoni. Il-kalkolu għall-eżempju fuq imsemmi huwa muri fit-Tabella 1.

▼B

Tabella 1

Kalkolu ta' l-intermedju kkalkulat maż-żmien

Tiġdid Nru	Ġranet	Konċ0	Konċ1	Ln (Konċ0)	Ln (Konċ1)	Erja
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Total ta' ġranet: 7					Erja totali	50,091
					Intermedju TW	7,156

Ġranet huwa n-numru ta' ġranet fil-perjodu ta' tiġdid.

Konċ0 hija l-konċentrazzjoni imkejla fil-bidu ta' kull perjodu ta' tiġdid.

Konċ1 hija l-konċentrazzjoni imkejla fit-tmiem ta' kull perjodu ta' tiġdid.

Ln(Konċ0) huwa l-logaritmu naturali tal-Konċ0.

Ln(Konċ1) huwa l-logaritmu naturali tal-Konċ1.

L-intermedju kkalkulat maż-żmien ("intermedju TW") huwa l-"Erja totali" diviża mit-"Total ta' ġranet".

$$Erja = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times Ġranet$$

Erja hija l-erja taħt il-kurva esponenzali għal kull perjodu ta' tiġdid. Hija kkalkulata hekk:

Naturalment, għall-eżami ta' riproduzzjoni tad-*Daphnia* it-tabella ikollha tiġi estiża biex tkopri 21 ġurnata.

Huwa ċar li meta jsiru osservazzjonijiet biss fil-bidu u fit-tmiem ta' kull perjodu ta' tiġdid, m'huwiex possibbli li jiġi kkonfermat li l-proċess ta' tħassir huwa, fil-fatt, esponenzali. F'kalkolu differenti għall-"Erja" tirriżulta kurva differenti. Madankollu, il-proċess tat-tħassir esponenzali huwa plawsibbli u probabilment huwa l-aħjar kurva li tista' tintuża fl-assenza ta' aktar informazzjoni.

Madankollu, hemm bżonn li jsir xogħol b'kawzjoni jekk l-analiżi kimika tonqos milli ssib xi sustanza fl-aħħar tal-perjodu ta' tiġdid. Kemm-il darba ma jkunx possibbli li ssir valutazzjoni ta' kemm is-sustanza tisparixxi malajr mit-taħlila, inkun impossibbli li tinkiseb erja realistika taħt il-kurva u għalhekk ikun impossibbli li jinkiseb intermedju raġonevoli kkalkulat maż-żmien.

▼B

C.21. MIKROORGANIŻMI TAL-ĦAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAN-NITROĠENU

1. METODU

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 216 (2000)

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-Metodu tat-Testijiet jiddiskrivi metodu tal-laboratorju iddisinjat sabiex jinvestiga l-effetti fit-tul ta' kimiċi, wara espożizzjoni waħda, dwar l-attività tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu fil-mikroorganiżmi tal-ħamrija It-test huwa prinċipalment ibbażat fuq ir-rakkommandazzjonijiet ta' l-Organizzazzjoni għall-Protezzjoni tal-Pjanti Ewropej u tal-Mediterran (1). B'dana kollu, Linji ta' Gwida oħrajn, inklużi dawk tal-Biologische Bundesanstalt tal-Ġermanja (2), il-US Environmental Protection Agency (3) il-SETAC (4) u International Organization for Standardization (ISO) (5), kienu wkoll meqjusa. Laqgħa ta' ħidma tal-OECD dwar is-Selezzjoni tal-ħamrija/-sediment li kienet inżammet fi Belgirate, l-Italja, fil-1995 (6) qabel dwar in-numru u t-tipi tal-ħamrija għall-użu f'dan it-test. Rakkommandazzjonijiet dwar il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-kampjun tal-ħamrija huma ibbażati fus id-Dokument ta' Gwida ISO (7) u r-rakkommandazzjonijiet mil-Laqgħa ta' Ħidma ta' Beligrate. Fl-assaġġ u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tas-sustanzi tat-test, determinazzjoni ta' l-effetti fuq l-attività mikrobjali tal-ħamrija tista tkun meħtieġa, eż., meta l-informazzjoni dwar l-effetti potenzali minnaħa tal-protezzjoni tal-prodotti ta' l-uċuħ fuq il-mikroflora tal-ħamrija huma meħtieġa jew meta l-espożixxjoni ta' mikroorganiżmi tal-ħamrija lejn kimiċi apparti milli l-prodotti tal-protezzjoni tal-ħamrija, jkunu mistennija. It-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa mwettaq sabiex jiddetermina l-effetti ta' tali kimiċi fuq il-mikroflora tal-ħamrija. Jekk l-agrikimiċi (eż., il-prodotti talk-protezzjoni tal-ħamrija, l-fertilizzanti, u l-kimiċi tal-foresterija) huma ittestjati, kemm it-trasformazzjoni tan-nitroġenu u wkoll it-testijiet tat-trasformazzjoni tal-karbonu, huma mwettqa. Jekk dawk li ma humiex l-agrokimiċi huma ittestjati, it-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa suffiċjenti. B'dana kollu, jekk il-valuri EC5O tat-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu għal tali kimiċi jidħol fi ħdan il-medda miosjuba għal inibituri tan-nitrifikazzjoni kummerċjalment disponibbli (eż. nitrapyrin), test tat-trasformazzjoni tal-karbondu jista jkun imwettaq sabiex tkun akkwistata aktar informazzjoni.

Il-ħamrija tikkonsisti minn komponenti ħajjin u mhux-ħajjin li jeżistu f'taħlitiet kumplessi u eteroġenji. Il-mikroorganiżmi għandhom parti ta' rwol impoprtanti fit-tfarrik u t-traformazzjoni tal-meterja organika f'ħamrija fertili b'ħafna speċje jikkontribwixxu għal diversi aspetti tal-fertilià tal-ħamrija. Kwalunkwe interferenza fit-tul ma dawn il-proċessi biokimiċi jista jkollha l-potenzal li tinterferixxi maċ-ċiklu tan-nutrient u dan jista jibdel il-fertilità tal-ħamrija. It-trasformazzjoni tal-karbonju u n-nitroġenu isseħħ fil-ħamrija fertili kollha. Għalkemm il-kommunitajiet mikrobjali responsabbli għal dawn il-proċessi jiddifferixxu bejn ħamrija u oħra, il-mezzi tat-trasformazzjoni huma essenzalment l-istess.

Dan il-Metodu ta' Testijiet kif deskritt huwa iddisinjat sabiex jiżvela l-effetti ħżiena ta' terminu fit-tul ta' sustanza dwar il-proċess tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu f'ħamrija erobika tal-wiċċ. Dan il-Metodu tat-test jippermetti wkoll l-estimi ta' l-effetti tas-sustanzi fuq it-trasformazzjoni tal-karbonju mill-mikroflora tal-ħamrija. Il-formazzjoni tan-nitrat isseħħ sussegwentament għad-deġenerazzjoni tar-rabtiet karbonju-nitroġenu. Għalhekk, jekk rati egwali tal-produzzjoni tan-nitroġenu jkunu misjuba f'ħamrija ittrattata u tal-kontroll, dan huma ferm probabbli minħabba li l-passaġġi tad-degradazzjoni maġġura tal-karbonju huma intatti u funzjonali. Is-substrata magħżulha għat-test (tagħsida luċerna fi trab) għandha telattività favorevoli ta' karbonju u nitroġenu (normalment bejn 12/1 u 16/1). Minħabba dan, in-nuqqas ta' karbonju huma aġevolat matul it-test u jekk il-kommunitajiet mikrobjali huma bil = ħsara kinn xi kimika, dawn jistgħu jirkupraw fi żmien 100 jum.

▼B

It-testijiet li minnhoma dn il-metodu ta' testijiet kien ġie żviluppat kienu primarjament iddisinjati għal sustanzi li dwarhom l-ammont li jilħaq il-ħamrija setgħa jkun antiċipat. Dan hu l-każ, per eżempju, għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ li dwarhom ir-rata ta' l-applikazzjoni fl-għelieqi hija magħrufa. Għall-agrokimiki, it-testijiet ta' żewġ doži relevanti għar-rata antiċipata jew imbassra ta' l-applikazzjoni huma suffiċjenti. L-agrokimiċi jistgħu ikunu ittestjati bħala ingredjenti attivi (a.i.) jew prodotti formulati. B'dana kollu, it-test mhux limitat għall-agrokimiċi. Bit-tibdil kemm ta' l-ammonti tas-sustamnza tat-test applikata fil-ħamrija, u il-mod ta' kif l-informazzjoni hija evalwata, it-test jista wkoll ikunu użat għal kimiċi li dwarhom l-ammont mistenni li jilħaq il-ħamrija ma jkunx maghruf. Għalhekk, bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi, l-effetti ta' serje ta' konċentrazzjonijiet dwar it-trasformazzjoni tan-nitroġenu, huma determinati. L-informazzjoni minn dawn it-testijiet hija użata sabiex tipprepara il-kurva tad-doża-reazzjoni u tikkalkola il-valuri Ecx, meta x hija definita bħala % effett.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Trasformazzjoni tan-nitroġenu: Hija d-deghradazzjoni aħħarija mill-mikroorganiżmi tal-materja organika li jkun fiha n-nitroġenu, via l-proċess ta' l-ammonifikazzjoni u n-nitrifikazzjoni, lejn in-nitrat inorganiku tal-prodott finali rispettivament.

Ec_x (Konċentrazzjoni Effettiva): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija li tirriżulta f'xi persentaġġ inibizzjoni tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu lejn nitrat.

EC_{5O} (Konċentrazzjoni Effettiva Medjana): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija li tirriżulta fi 50 persentaġġ (50 %) inibizzjoni tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu lejn nitrat.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Ħamrija mgħarbla hija emendata ma tgħasida tal-pjanti li ssir trab u jew ittrattata bis-sustanza tat-test jew imħollija mhux ittrattata (kontroll). Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, minimu ta' żewġ konċentrazzjonijiet tat-test huma rakkommandati u dawn għandhom ikunu magħżula b'reazzjoni ma l-għola konċentrazzjoni antiċipata fl-għalqa. Wara 0, 7, 14-il jum u 28 jum ta' l-inkubazzjoni, kampjuni ta' ħamrija ittrattata u tal-kontroll huma estratti bis-solvent xieraq, u l-kwantitajiet ta' nitrat fl-estratti huma determinati. Ir-rata tal-formazzjoni tan-nitrat fil-kampjuni ittratti huwa paragunata mar-rata fil-Kontrolli, u d-fevjazzjoni perċentwali ta' dik ittrattata mill-kontrol hija ikkalkolata. It-testijiet kollha jkunu mill-anqas ta' 28 jum. Jekk, fit-28 jum, id-differenzi bejn il-ħamrija ittrattata u dik mhux ittrattata huma egwali jew akbar minn 25 %, il-kejl jitkompla sa massimu ta' 100 jum. Jekk agrokimiċi huma ittestjati, serje ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test huma miżjuda mal-kampjuni tal-ħamrija, u l-kwantitajiet tan-nitrat iffurmat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma mkejla wara 28 jum ta' inkubazzjoni. Ir-riżultati mit-testijiet b'konċentrazzjonijiet multipli huma analizzati bl-użu ta' mudell regressiv, u l-valuri Ecx huma ikkalkolati (i.e. EC_{50}, EC_{25} u/jew EC_{10}). Ara definizzjonijiet.

1.5. IL-VALIDITÀ TAT-TEST

L-evalwazzjonijiet tar-riżultati tat-test ma l-agrokimiċi huma bbażati fuq relattivament differenzi żgħar (i.e. medja ta' valur ± 25 %) bejn il-konċentrazzjonijiet nitriċi fil-ħamrija tal-kontroll u f'dik ittrattata, għalhekk varjazzjonijiet kbar fil-kontrolli jistgħu jwasslu għal riżultati foloz. Għalhekk, il-varjazzjoni bejn kampjunu mġedda tal-kontroll għandha tkun ta' anqas minn ± 15 %.

▼B

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Apparat**

Il-kontenituri tat-test użati huma magħmula minn materjal kemikament inert. Dawn għandhom ikunu ta' daqs xieraq b'konformità mal-proċedura użata għall-inkubazzjoni tal-ħamrija. i.e. l-inkubazzjoni fil-massa jew bħala serje individwai ta' kampjuni tal-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.7.1.2). Attenzjoni qawwija għandha tingħata sabiex ikun minimizzat it-telf ta' l-ilma u li jkun imħolli l-iskambju tal-gass matul it-test (eż. il-kontenituri tat-test jistgħu ikunu mogħttija b'folja tal-polyethylene mtaqqba). Meta jkunu ittestjati sustanzi volatili, kontenituri li jistgħu ikunu ssiġġilati u li ma jgħaddix gass minnhom għandhom ikunu wżati. Dawn għandhom ikunu ta' daqs li madwar kwart tal-volum tagħhom ikun mimli bil-kampjun tal-ħamrija.

Apparat normali tal-laboratorju, inkluż dan li ġej, huwa wżat:

— apparat ta' l-aġitazzjoni:: ċelċieka mekkanika jew apparat ekwivalenti;

— ċentrifuga (3 000 g) jew apparat tal-filtrazzjoni (bl-użu tal-karta tal-filtru ħielsa min-nitrat);

— strument ta' sensittivit adekwata u tar-riproduċċibbiltà għall-analiżi tan-nitrat.

1.6.2. **L-għażla u n-numu ta' ħamrija**

Ħamrija waħda hija użata. Il-karatteristiċi rakkommandati tal-ħamrija huma kif ġej:

— kontenut tar-ramel: Mhux inqas minn 50 % imma mhux iktar minn 75 %;

— pH: 5,5 - 7,5;

— kontenut tal-karbonju organiku: 0,5 – 1,5 %;

— il-biomassa mikrobjali għandha tkun imkejla (8)(9) u l-pkontenut tal-karbonju tagħha għandu jkun ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali tal-ħamrija.

F'bosta każi, ħamrija b'dawn il-karatteristiċi tirrapreżenta l-għar każ ta' sitwazzjoni, la darba l-adsorbazzjoni tal-kimika tat-test hija l-minimu u d-disponnabbiltà tagħha lejn il-mikroflora hija l-massimu. B'konsegwenza, it-testijiet b'ħamrija oħra huma, ġeneralemnt, mhux meħtieġa. B'dana kollu, f'ċerti ċirkostanzi, eż. meta l-użu maġġuri antiċipat tas-sustanza tat-test f'ħamrija partikolari, bħal ma huma l-ħamrija aċiduża tal-foresti, jew għal kimiċi ikkargati elettrostatikament, jista jkun meħtieġ li tintuża ħamrija addizzjonali.

▼B

1.6.3. **Il-ġbir u l-ħażna tal-kampjunu tal-ħamrija**

1.6.3.1. *Il-ġbir*

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-għalqa minn fejn il-ħamrija tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġetali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, żidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Is-sit magħżul għall-ġbir tal-ħamrija għandu jkun wieħed li jippermetti użu f'terminu twil. Mergħat permanenti, għelieqi b'uċuħ annwali taċ-ċereali (apparti mill-qamħ-ir-rum) jew dawk moghtija d-demel b'żergħat iffullata, huma tajbin. Il-għażla tas-sit tal-kampjunar m'għandhiex tkun ġiet trattata bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ għam mill-anqas sena qabel il-kampjunar. Ukoll, l-ebda fertilizzant organiku ma jkun ġie applikat għal mill-anqas sitt xhur. L-użu ta' fertilizzant minerali huwa aċċettabbli biss meta, b'konformità mal-ħtiġiet tal-kampjuni ta' l-uċuħ u tal-ħamrija, m'għandhomx ikunu miġbura għal mill-anqas tlett xhur wara l-applikazzjoni tal-fertilizzant. L-użu ta' ħamrija trattata bil-fertilizzanti li għandhom effetti bijoċidali magħrufa (eż. is-sijanamid tal-kalċju) għandu jkun evitat.

Il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (itwal minn 30 jum) ta' nixfa jew ta' stgħadir bl-ilma. Għal ħamrija maħruta, il-kampjuni għandhom jinġabru minn fond ta' 1 sa 20 cm l-isfel. Għall art tal-mergħa (art fil-ħaxix) jew ħamrija oħra meta l-ħrit ma jseħħx matul perijodi twal (f'mill-anqas staġun wieħed tat-tkabbir), il-fond massimu tal-kampjunar jista jkun kemm xejn aktar minn 20 cm (eż. sa 25 cm).

Il-kampjuni tal-ħamrija għandhom ikunu trasportati bl-użu ta' kontenituri u skond kondizzjonijiet tat-temperatura li jiggarantixxu li l-propjetajiet inizjali tal-ħamrija ma jkunux sinifikament mibdula.

1.6.3.2. *Ħażna*

L-użu ta' ħamrija miġbura friska mill-għelieqi huwa ippreferut. Jekk ħażna fil-laboratorju ma tistgħax tkun evitata, il-ħamrija tista tkun maħżuna fid-dlam 4 ± 2 °C għal massimu ta' tlett xhur. Matul il-ħażna tal-ħamrija, il-kondizzjonijiet erobiċi għandhom ikunu assigurati. Jekk il-ħamrija tkun miġbura minn żoni ta' fejn din tkun iffriżata għal mill-anqas tlett xhur tas-sena, il-ħażna għal sitt xhur fi – 18 °C sa – 22 °C tista tkun ikkonsidrata. Il-biomassa mikrobjali tal-ħamrija maħżuna hija mkejla qabel kull esperiment u l-karbonju fil-biomassa għandu jkun mill-anqas 1 % tal-kontenut totali tal-karbonju organiku fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.2).

1.6.4. **Tqandil u l-Preparazzjoni tal-HAmrija għat-Test**

1.6.4.1. *Preinkubazzjoni*

Jekk il-ħamrija kienet maħżunha (ara s-sezzjoni 1.6.3.2), preinkubazzjoni hija rakkommandata għal perijodu ta' bejn 2 u 28 jum. It-temperatura u l-umidità tal-kontenut tal-ħamrija matul il-preinkubazzjoni għandhom ikunu simili għal dik użata fit-test (ara s-sezzjonijiet 1.6.4.2 u 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Karatteristiċi fiżiko-kimiċi*

Il-ħamrija hija manwalment imnaddfa minn oġġeti kbar (eż. ġebel, partijiet ta' pjanti, eċċ.) u imbagħad magħrbla fin-nieda mingħajt tnixxif eċċessiv lejn daqs ta' partiċelli ta' anqas minn jew egwali għal 2 mm. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kampjun tal-ħamrija għandu jkun aġġustat b'ilma distillat jew dejonizzat lejn valur ta' bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma.

1.6.4.3 *Amendi b'substrata organika*

Il-ħamrija għandha tkun emendata b'substrata organika xierqa, eż. tgħasida mrammla luċerna-ħaxix-ħadranija (il-komponent ewlieni: Medicago sativa) b'relattività C/N ta' bejn 12/1 u 16/1. Ir-relattività rakkommandata tal-ħamrija luċerna hija ta' 5 g luċern kull kilogramma ta' ħamrija (piz xott).

1.6.5. **Preparazzjoni tas-sustanza tat-test għall-applikazzjoni mal-ħamrija**

Is-sustanza tat-test hija normalment applikata bl-użu ta' trasportatur. It-trasportatur jista jkun ilma (għal sustanzi li jinħallu fl-ilma) jew solidu inert bħal ma huwa ramel fin tal-kwartz (daqs tal-partiċella: 0,1 - 0,5 mm). Trasportaturi likwidi apparti mill-ilma (eż. solventi organiċi bħal ma huma l-aċetun, il-kloroforma) għandhom ikunu evitati la darba dawn jistgħu joħolqu ħsara għall-mikroflora. Jekk ir-ramel ikunu użat bħala trasportatur, dan jista jkun m iksi bis-sustanza tat-test imdewba jew sospiża f'solvent xieraq. F'tali każi, is-solvent għandu jkun imneħħi bl-evaporazzjoni qabel it-taħlit mal-ħamrija. Għall-aħjar distribuzzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija, relattività ta' 10 g ramel ma kull kilogramma ta' ħamrija (piż xott) huwa rakkommandabbli. Kampjuni tal-kontroll huma ittrattati b'ammont ekwivalenti ta' ilmaa u/jew ramel kwartz biss.

Meta jkunu ittestjati kemikali volatili, it-telf matul it-trattament għandu jkun evitat sa kemm dan ikun possibbli u tentattiv għandu jsir sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja fil-ħamrija (eż. is-sustanza tat-test għandha tkun injettata fil-ħamrija minn diversi postijiet).

1.6.6. **Konċentrazzjonijiet tat-test**

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas żewġ konċentrazzjonijiet għandhom ikunu wżati. Il-konċentrazzjoni l-baxxa għandha tirrifletti mill-anqas l-ammont massimu mistenni li jilħaq il-ħamrija waqt kondizzjonijiet prattiċi, fil-waqt li l-konċentrazzjoni l-għolja għandha tkun mutiplu tal-konċentrazzjoni l-baxxa. Il-konċentrazzjonijiet ta' sustanza tat-test miżjuda mal-ħamrija huma kkalkolati billi tkun preżunta inkorporazzjoni uniformi sa fond ta' 5 cm u l-massa tal-ħamrija f'densità ta' 1.5. Għall-agrokimiċi li huma applikati direttament mal-ħamrija, jew għal kimiċi li dwarhom il-kwantità li tilħaq il-ħamrija tista tkun prevista, il-konċentrazzjonijiet tat-test irrakkommandati huma l-massimu Predicted Environmental Concentration (PEC) (Konċentrazzjoni Ambjentali Mbassra) u ħames darbiet dik il-konċentrazzjoni. Is-sustanzi li huma mistennija li jkunu applikati diversi drabi mal-ħamrija fi staġun wieħed għandhom ikunu ittestjati fil-konċemntrazzjonijiet derivati mill-multiplikazzjoni tal-PEC bin-numru massimu antiċipat ta' l-applikazzjonijiet. L-għoila konċentrazzjoni ittestjata, b'dana kollu, m'għandhiex teċċedi għaxar darbiet il-massimu tar-rata ta' applikazzjoni waħda. Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, serje ġeometrikuta' mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet għandu jkun użat. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda meħtieġa tal-valuri EC_x.

▼B

1.7. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.7.1. **Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.7.1.1. *It-trattament u l-kontrol*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża fi tlett porzjonijiet ta' piż egwali. Żewġ porzjonijiet huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih il-prodott, u l-ieħor huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-prodott (kontroll). Minimu ta' tliet repliki kemm għall-ħamrija ittrattata u wkol mhux ittrattata huma rakkommandati. Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża f'sitt porzjonijiet ta' piż egwali. Ħamsa mill-kampjunu huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih is-sustanza tat-test, u s-sitt kampjun huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-kimika. Tlett replikati taż-żewġ trattamenti u tal-kontroll huma rakkommandati. Attenzjoni għandha tingħata sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja tas-sustanza tat-test fil-kampjunu tal-ħamrija ittrattata. Matul it-taħlit, l-ikkumpattjar jew gerbubi mgħaqqda għandhom ikunu evitati.

1.7.1.2. *L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija*

L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija tista titwettaq b'żewġ modi: Bħala kampjuni fil-massa ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata jew f'serje ta' sub-kampjuni individwali u ta' daqs egwali ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata. B'dana kollu, meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali. Meta l-ħamrija tkun inkubata fil-massa, kwantitajiet kbar ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata huma ippreparati u s-sub-kampjuni għall-analiżi huma miġbura kif meħtieġ matul it-test. L-ammont inizjalment ippreparat għal kull trattament u kontroll jiddependi mid-daqs tas-sub-kampjuni, in-numru ta' repliki użati għall-analiżi u n-numru massimu antiċipat tad-drabi tal-kampjunar. Il-ħamrija inkubata fil-massa għamndha tkun imħallta sewwa qabel is-sub-kampjuni. Meta l-ħamrija hija inkubata f'serje individwali ta' ħamrija, kull ħamrija ittrattata jew mhux trattata fil-massa hija diviża fin-numru meħtieġ ta' sub-kampjuni, u dawn huma utilizzati kif meħtieġ. Fl-esperimenti ta' meta tnejn jew aktar ħinijiet tal-kampjunar jistgħu ikunu antiċipati, sub-kampjuni biż-żejjed għandhom ikunu ippreparati sabiex ikun hemm abbastanza għar-replikati kollha u d-drabi tal-kampjunar kollu. Mill-anqas tlett kampjuni tar-replikati tal-ħamrija tat-test għandhom ikunu inkubati permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi (ara s-sezzjoni 1.7.1.1). Matul it-testijiet kollha, kontenituri xierqa, bi spazju fil-wiċċ suffiċjenti, għandhom ikunu użati sabiex ikunu evitati l-kondizzjonijiet anerobiċi. Meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali.

1.7.1.3. *Il-kondizzjonijiet u t-tul tat-testijiet*

It-test huwa mwettaq fid-dlam f'temepratura tal-kamra ta' 20 ± 2 °C. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kamjuni tal-ħamrija għandu jkun miżmum matul it-test għal bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.4.2) b'medda ta' ± 5 %. Ilma distillat jew deonizzat jista jkun miżjud kif meħtieġ.

It-tul minimu tat-testijiet huwa 28 jum. Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, ir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma mqabbla. Jekk dawn ikunu differenti b'aktar minn 25 % fil-jum 28, it-test jitkompla sakemm differenza egwali għal, jew anqas minn 25 % tkun akkwistata, jew għal massimu ta' 100 jum, liema minnhom ikun l-aqsar. Għal dawk li ma humiex agrokimiċi, it-test ikun terminat wara 28 jum. Fil-jum 28, il-kwantitajiet tan-nitrat fil-kampjuni tal-ħamrija ittrattata jew tal-kontroll huma determinati u l-valuri EC_x ikunu ikkalkolati.

▼B

1.7.2. **Kampġjunaar u analiżi tal-ħamrija**

1.7.2.1. *Kampjunar skedat tal-ħamrija*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-kampjuni tal-ħamrija huma analiżżati għan-nitrat fil-jiem 0, 7, 14 u 28. jekk test imtawwal ikun meħtieġ, aktar kejl għandu jseħħ f'intervalli ta' 14-il jum, wara l-jum 28.

Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test huma wżati u l-kampjuni tal-ħamrija huma analiżżati għan-nitrat fil-bidu (jum 0) u fit-tmiem tal-perijodu ta' l-espożizzjoni (28 jum). Kejl intermedju, eż. fil-jum 7, jista jkun miżjud jekk dan ikun meqjus bħala meħtieġ. L-informazzjoni akkwistata fil-jum 28 hija użata għad-determinazzjoni tal-valux EC_x dwar il-kimika. Jekk mixtieq, l-informazzjoni mill-jum 0 tal-kampjuni tal-kontroll jistgħu ikunu wżati sabiex jirraportaw il-kwanitità inizjali tan-nitrat fil-ħamrija.

1.7.2.2. *L-analiżi tal-kampjuni tal-ħamrija*

L-ammont ta' nitrat iffurmat f'kull replika trattata jew tal-kontroll huwa determinat f'kull waqt tal-kampjunar. In-nitrat huwa estratt mill-ħamrija biċ-ċekċik tal-kampjun b'solvent xieraq ta' l-estrazzjoni, eż. taħlita ta' 0,1 M klorid tal-putassa. Relattività ta' 5 ml tat-taħlita KC1 kull gramma piż xott ekwivalenti tal-ħamrija huwa rakkommandat. Sabiex tkun imtejba l-estrazzjoni, il-kontenituri li jkunu bil-ħamrija u t-taħlita ta' l-estrazzjoni m'għandhomx ikunu aktar minn nofshom mimlija. It-taħlitiet huma mċekċka fi 150 rpm għal 60 minuta. It-taħlitiet ikunu ċentrifugati jew filtrati u l-fażijiet likwidi huma analiżżati għan-nitrat. Estratti likwisi ħielsa minn partiċelli jistgħu ikunu maħżuna qabel l-analiżi fi - 20 ± 5 °C sa sitt xhur.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'agrokimiċi, il-kwalità yan-nitrat iffurmat f'kull replika tal-kampjun tal-ħamrija għandha tkun irreġistrata, u l-valuri medji tar-replikati kollha għandhom ikunu ipprovduti f'għamla tabulari. Ir-rati tat-trasformazzjoni tan-nbitroġenu għandhom ikunu evalwati b'metodi xierqa u ġeneralment aċċettabbli (eż. Test-F, 5 % livell sinifikanti). Il-kwantitajiet ta' nitrat iffurmat huma espressi fi mg nitrat/kg piż xott tal-ħamrija/kull jum. Ir-rata tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull trattament hija mqabbla ma dik tal-kontroll, u l-persentaġġ tad-devjazzjoni mill-kontroll hija ikkaalkolata.

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'dawk li ma humiex agrokimiċi, il-kantità ta' nitrat iffurmat f'kull replika huwa determinat, u l-kurva doża-reazzjoni hija ippreparata għall-estimi tal-valuri EC_x. Il-kwantitajiet ta' nitrat (i.e. mg nitrat.kg piż xottv tal-ħamrija) misjuba fil-kampjuni ittrattati wara 28 jum huma mqabbla ma' dak misjun fil-kontroll. Minn din l-informazzjoni, il- % tal-valuri ta' l-inibizzjoni għal kull konċentrazzjoni tat-test huma ikkalkolati.Dawn il-persentaġġi huma mpinġija kontra l-konċentrazzjoni, u l-proċeduri statistiċi huma mbagħad użati għall-kalkolu tal-valuri EC_x. Limiti ta' l-affidabbilità (p = 0,95) għal ECx ikkalkolati huma wkoll determinati bl-użu tal-proċeduri normali (10) (11) (12).

Is-sustanzi tat-test li jkollhom kwantitajiet għoljin ta' nitroġenu jistgħu jikkontribwixxu għall-kwantitajiet ta' nitrat iffurmat matul it-test. Jekk dawn is-sustanzi huma ttestjati f'konċentrazzjoni għolja (eż. kimika li hija mistennija li tkun użata f'applikazzjonijiet repetuti) kontrolli xierqa għandhom ikunu inklużi fit-test (i.e. il-ħamrija flimkien mas-sustanza tat-test imma mingħajr it-tgħasida tal-pjanti). Dettalji minn dawn il-kontrolli għandhom ikunu nklużi fil-kalkoli tal- EC_x.

▼B

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Meta r-riżultati mit-testijiet bl-agrokimiċi huma evalwati, u d-differenza fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat bejn it-trattament baxx (i.e. il-massimu tal-konċentrazzjoni prevista) u l-kontroll tkun egwali għal, jew anqas minn 25 % fi kwalunkwe kampjun fil-waqt wara l-jum 28, il-prodott jista jkun evalwat bħala li jkollu infuwenza f'terminu fit-tul fuq it-trasformazzjoni tan-nitroġenu fil-ħamrija. Meta r-riżultati mit-testijiet bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi huma evalwatim il-valuri EC_{50}, EC_{25} u/jew EC_{10} huma wżati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Identifikazzjoni sġiġa tal-ġamrija użata, inkluż:

— refernza ġeografika tas-sit (latitudini, lonġitudini);

— informazzjoni dwar l-istorja tas-sit (i.e. il-koperta veġittiva, it-trattamenti bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ, trattamenti bil-fertilizzanti, kontaminazzjoni aċċidentali, eċċ.);

— is-sekwenza ta' l-użu (eż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.);

— il-fond tal-kampjunar (cm);

— il-kontenut ramel/ħama'/tafal (% tal-piż);

— pH (fl-ilma);

— kontenut tal-karbonju organiku (% piż xott);

— kontenut tan-nitroġenu organiku (% piż xott);

— il-konċentrazzjoni inizjali tan-nitrat (mg nitrat kg piż xott);

— kapaċità ta' l-iskambju tal-jonju (mmol/kg);

— biomassa mikrobjali f'termini ta' persentaġġ tal-karbonju organiku totali;

— referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru;

— l-informazzjoni li tirrigwardja il-ġbir u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija;

— Is-sustanza tat-test:

dettalji tal-pri-inkubazzjoni tal-ħamrija, jekk ikun hemm.

— in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;

— l-informazzjoni ta' l-identifikazzjoni kimika, meta relevanti, inkluża l-formula strutturali, il-purità (i.e. għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ il-persentaġġ ta' l-ingredjent attiv), il-kontenut tan-nitroġenu.

Substrata:

— is-sorsi tas-*substrata*

— il-komposizzjoni (i.e. tgħasida luċerna, it-tgħasida luċerna-ħaxix-ħdura);

— kontenut tal-karbonju u tan-nitroġenu (% piż xott);

— id-daqs ta' l-imgħarbel (mm).

▼B

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji ta' l-emenda tal-ħamrija b'*substrata* organika;

— in-numru tal-konċentrazzjonijiet fil-kimika tat-test użata u, meta xieraq, ġustifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet magħżula;

— dettalji ta' l-applikazzjoni tas-*substrata* tat-test fil-ħamrija;

— temperatura ta' l-inkubazzjoni;

— il-kontenut ta' l-umidità fil-bidu u matul it-test;

— il-metodu użat ta' l-inkubazzjoni tal-ħamrija (i.e. bħala massa jew bħala serje ta' subkampjuni individwali);

— in-numru ta' replikati;

— id-drabi tal-kampjuna;

— Riżultati:

il-metodu użat għall-estrazzjoni tan-nitrat mill-ħamrija.

— proċedura analitika u l-apparat użat fl-analiżi tan-nitrat;

— dettalji tabulati, inklużi il-valuri individwali u medji għall-kejl tan-nitrat;

— il-varjazzjoni bejn ir-replikati fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll;

— spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet imwettqa fil-kalkoli, jekk relevanti;

— il-varjazzjoni perċentwali fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull waqt tal- kampjunar, jekk xieraq, il-limitu ta' l-affidibbilità tal-valur EC_{50} b'95 fil-mijja affidibbilità, EC_x oħrajn (i.e. EC_{25} jew EC_{10}) b'intervalli ta' l-affidibbilità, u grafika tal-kurva doża-reazzjoni;

— riżultati statitiċi tat-trattament;

— l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jkunu ta' għajnuna fl- interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality – Biological Methods.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18-20 janvier 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass -Part 1: Substrateinduced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass -Part 2: Fumigationextraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New - York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. **MIKROORGANIŻMI TAL-ĦAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAL-KARBONJU**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 217 (2000)

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-Metodu tat-testijiet jiddeskrivi metodu tal-laboratorju iddisnjat sabiex jinvestiga l-effetti potenzjoni f'terminu fit-tul ta' espożizzjoni singola tal-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ u possibbilment kemikali oħrajn fuq l-attività tat-trasformazzjoni tal-karbomnju f'mikroorgaiżmi tal-ħamrija. It-test huwa prinċipalment ibbażat fuq ir-rakkommandazzjonijiet ta' l-Organizzazzjoni għall-Protezzjoni tal-Pjanti Ewropej u tal-Mediterran (1). B'dana kollu, Linji ta' Gwida oħrajn, inklużi dawk tal-Biologische Bundesanstalt tal-Ġermanja (2), il-US Environmental Protection Agency (3) il-SETAC (4), kienu wkoll meqjusa. Laqgħa ta' Ħidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Ħamrija/Sediment li nżammet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (5) qablet dwar in-numru u t-tip ta' ħamrija għall-użu f'dan it-test. Rakkommandazzjonijiet għall-ġbir, tqandil u l-ħażna tal-kampjun tal-ħamrija huma ibbażai fuq Dokument ta' Gwida ISO (6) u r-rakkomandazzjonijiet tal-Laqgħa ta' Ħidma ta' Belgirate.

Fl-assaġġ u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tas-sustanzi tat-test, determinazzjoni ta' l-effetti fuq l-attività mikrobjali tal-ħamrija tista tkun meħtieġa, eż., meta l-informazzjoni dwar l-effetti potenzjali min-naħa tal-protezzjoni tal-prodotti ta' l-uċuħ fuq il-mikroflora tal-ħamrija huma meħtieġa jew meta l-espożizzjoni ta' mikroorganiżmi tal-ħamrija lejn kimiċi apparti milli l-prodotti tal-protezzjoni tal-ħamrija, jkunu mistennija. It-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa mwettaq sabiex jiddetermina l-effetti ta' tali kimiċi fuq il-mikroflora tal-ħamrija. Jekk l-agrikimiċi (eż., il-prodotti tal-protezzjoni tal-ħamrija, l-fertilizzanti, u l-kimiċi tal-foresterija) huma ittestjati, kemm it-trasformazzjoni tan-nitroġenu u wkoll it-testijiet tat-trasformazzjoni tal-karbonu, huma mwettqa. Jekk dawk li ma humiex l-agrokimiċi huma ittestjati, it-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa suffiċjenti. B'dana kollu, jekk il-valuri EC5O tat-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu għal tali kimiċi jidħol fi ħdan il-medda misjuba għal inibituri tan-nitrifikazzjoni kummerċjalment disponibbli (eż. nitrapyrin), test tat-trasformazzjoni tal-karbondu jista jkun imwettaq sabiex tkun akkwistata aktar informazzjoni.

Il-ħamrija tikkonsisti minn komponenti ħajjin u mhux-ħajjin li jeżistu f'taħlitiet kumplessi u eteroġenji. Il-mikroorganiżmi għandhom parti ta' rwol impoprtanti fit-tfarrik u t- traformazzjoni tal-meterja organika f'ħamrija fertili b'ħafna speċi jikkontribwixxu għal diversi aspetti tal-fertilità tal-ħamrija. Kwalunkwe interferenza fit-tul ma' dawn il-proċessi bijokimiċi jista' jkollha l-potenzal li tinterferixxi maċ-ċiklu tan-nutrient u dan jista jibdel il-fertilità tal-ħamrija. It-trasformazzjoni tal-karbonju u n-nitroġenu sseħħ fil-ħamrija fertili kollha. Għalkemm il-kommunitajiet mikrobjali responsabbli għal dawn il-proċessi jiddifferixxu bejn ħamrija u oħra, il-mezzi tat-trasformazzjoni huma essenzjalment l-istess.

▼B

Dan il-Metodu ta' Testijiet kif deskritt huwa iddisinjat sabiex jiżvela l-effetti ħżiena ta' terminu fit-tul ta' sustanza dwar il-proċess tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu f'ħamrija erobika tal-wiċċ. It-test huwa sensittiv għal kambju fid-daqs u l-attività tal-kommunitajiet mikrobjali responsabbli għat-trasformazzjoni tal-karbonju la darba jissuġġetti dawn il-kommunitajiet kemm lejn l-impenn kemikali u wkoll għal nuqqas gravi ta' karbonju. Ħamrija mramma baxxa f'materja organika hija użata. Din il-ħamrija hija ittrattata bis-sustanza tat-test u inkubata permezz tal-kondizzjonijiet li jippermettu mataboliżmu mikrobjali mħaffef. Permezz ta' dawn il-kondizzjonijiet, sorsi ta' karbonju faċilment disponibbli fil-ħamrija huma malajr eżawriti. Dan jikkaġuna skarzezza tal-karbonju li kemm jiqtol iċ-ċelloli mikrobjali u wkoll jinduċi rqad u/jew sporlazzjoni. Jekk it-test ikun imwettaq għal aktar minn 28 jum, is-somma ta' dawn ir-reazzjonijiet tista tkun imkejla bi (ħamrija mhux trattata) kontrolli bħala telf progressiv tal-biomassa mikrobjali metabolikament attiva (7). Jekk il-biomassa tal-ħammrija mċaħħda mill-karbonju, skond il-kondizzjonijiet tat-test, hija affettwata bil-preżenza ta' kimika, jista jkun il-każ li din ma terġal lura lejn l-istess livell bħal fil-kontroll. Għalhekk, disturnazi ikkaġunati bis-sustanza tat-test fi kwalunkwe hin matul it-test ta' spiss iddum sat-tmiem tat-test.

It-testijiet li minnhom dan il-metodu ta' testijiet kien ġie żviluppat kienu primarjament iddisinjati għal sustanzi li dwarhom l-ammont li jilħaq il-ħamrija setgħa jkun antiċipat. Dan hu l-każ, per eżempju, għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ li dwarhom ir-rata ta' l-applikazzjoni fl-għelieqi hija magħrufa. Għall-agrokimiki, it-testijiet ta' żewġ doži relevanti għar-rata antiċipata jew imbassra ta' l-applikazzjoni huma suffiċjenti. L-agrokimiċi jistgħu ikunu ittestjati bħala ingredjenti attivi (a.i.) jew prodotti formulati. B'dana kollu, it-test mhux limitat għall-kimiċi b'konċentrazzjonijiet ambjentali prevedibbli. Bit-tibdil kemm ta' l-ammonti tas-sustamnza tat-test applikata fil-ħamrija, u l-mod ta' kif l-informazzjoni hija evalwata, it-test jista wkoll ikunu wżat għal kimiċi li dwarhom l-ammont mistenni li jilħaq il-ħamrija ma jkunx maghruf. Għalhekk, bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi, l-effetti ta' serje ta' konċentrazzjonijiet dwar it-trasformazzjoni tal-karbonju, huma determinati. L-informazzjoni minn dawn it-testijiet hija użata sabiex tipprepara l-kurva tad-doża-reazzjoni u tikkalkola l-valuri Ec_x, meta hija definita bħala % effett.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Trasformazzjoni tal-karbonju: Hija d-degradazzjoni minn mikroorganiżmi ta' materja organika li tifforma il-prodott aħħari inorganiku tad-diossidu tal-karbonju.

EC_x (Konċentrazzjoni Effettiva): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija li tirriżulta fi x persentaġġ inibizzjoni tat-trasformazzjoni tal-karbonju lejn diossidu tal-karbonju.

EC_{50} (Konċentrazzjoni Effettiva Medjana): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija li tirriżulta fi 50 fil-mijja inibizzjoni tat-trasformazzjoni tal-karbonju lejn diossidu tal-karbonju.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn

▼B

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-ħamrija magħrbla hija jew ittrattata bis-sustanza tat-test jew imħollija mhux ittrattata (kontroll). Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, minimu ta' żewġ konċentrazzjonijiet tat-test huma rakkommandati u dawn għandhom ikunu magħżula b'reazzjoni ma l-għola konċentrazzjoni antiċipata fl-għalqa. Wara 0, 7, 14 u 28 jum ta' inkubazzjoni, kampjuni ta' ħamrija ittrattata u tal-kontroll huma mħallta bil-glukożju, u r-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju huma mkejla għal 12-il siegħa konsekuttivi. Ir-rate tar-respirazzjoni huma espressi bħala diossidu tal-karbonju rilaxxat (mg diossidu tal-karbonju/kd ħamrija xotta/fis-siegħa) jew ossiġenu ikkunsmat (mg ossiġenu/kg ħamrija/siegħa). Ir-rata medja tar-respirazzjoni fil-kampjuni tal-ħamrija ittrattata hima mqabbla ma dik fil-kontroll u d-devjazzjoni perċentwali tal-ħamrija ittrattata minn dik tal-kontroll hija ikkalkolata. It-testijiet kollha jkunu mill-anqas ta' 28 jum. Jekk, fit-28 jum, id-differenzi bejn il-ħamrija ittrattata u dik mhux ittrattata huma egwali jew akbar minn 25 %, il-kejl jitkompla sa massimu ta' 100 jum. Jekk kimiċi oħrajn apparti milli l-agrokimiċi huma ittestjati, serje ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test huma miżjuda mal-kampjuni tal-ħamrija, u r-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju (i.e. il-medja tal-kwantitajiet tad-diossidu tal-karbonju iffurmat jew l-ossiġenu ikkunsm, at) huma imkejja wara 28 jum. Ir-riżultati mit-testijiet b'konċentrazzjonijiet multipli huma analizzati bl-użu ta' mudell regressiv, u l-valuri Ec_x huma kkalkolati (i.e. EC_{50}, EC_{25} u/jew EC_{10}). Ara definizzjonijiet.

1.5. IL-VALIDITÀ TAT-TEST

L-evalwazzjonijiet tar-riżultati tat-test ma l-agrokimiċi huma bbażati fuq relattivament differenzi żgħar (i.e. medja ta' valur ± 25 %) bejn il-konċentrazzjonijiet nitriċi fil-ħamrija tal-kontroll u f'dik ittrattata, għalhekk varjazzjonijiet kbar fil-kontrolli jistgħu iwasslu għal riżultati foloz. Għalhekk, il-varjazzjoni bejn kampjuni mġedda tal-kontroll għandha tkun ta' anqas minn ± 15 %.

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Apparat**

Il-kontenituri tat-test użati huma magħmula minn materjal kemikament inert. Dawn għandhom ikunu ta' daqs xieraq b'konformità mal-proċedura użata għall-inkubazzjoni tal-ħamrija. i.e. l-inkubazzjoni fil-massa jew bħala serje individwai ta' kampjuni tal-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.7.1.2). Attenzjoni qawwija għandha tingħata sabiex ikun minimizzat it-telf ta' l-ilma u li jkun imħolli l-iskambu tal-gass matul it-test (eż. il-kontenituri tat-test jistgħu ikunu mogħttija b'folja tal-polyethylene mtaqqba). Meta jkunu ittestjati sustanzi volatili, kontenituri li jitgħu ikunu issiġġillati u li ma jgħaddix gass minnhom għandhom ikunu wżati. Dawn għandhom ikunu ta' daqs li madwar kwart tal-volum tagħhom ikun mimli bil-kampjun tal-ħamrija.

Għad-determinazzjoni tar-respirazzjoni indotta mill-glukożju, sistemi ta' inkubazzjoni u strumenti għall-kejl tal-produzzjoni tad-diossidu tal-karbonju jew tal-konsum ta' l-ossiġenu huma meħtieġa. Eżempji ta' tali sistemi u strumenti huma misjuba fil-letteratura (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **L-għażla u n-numu ta' ħamrija**

Ħamrija waħda hija użata. Il-karatteristiċi rakkommandati tal-ħamrija huma kif ġej:

— kontenut tar-ramel: Mhux inqas minn 50 % imma mhux iktar minn 75 %.

▼B

— pH: 5,5-7,5;

— kontenut tal-karbonju organiku: 0,5-1,5 %;

— il-biomassa mikrobjali għandha tkun imkejla (12)(13) u l-pkontenut tal- karbonju tagħha għandu jkun ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali tal- ħamrija.

F'bosta każi, ħamrija b'dawn il-karatteristiċi tirrapreżenta l-għar każ ta' sitwazzjoni, la darba l-adsorbazzjoni tal-kimika tat-test hija l-minimu u d-disponnabbiltà tagħha lejn il-mikroflora hija l-massimu. B'konsehwenza, it-testijiet b'ħamrija oħra huma, ġeneralemnt, mhux meħtieġa. B'dana kollu, f'ċerti ċirkostanzi, eż. meta l-użu maġġuri antiċipat tas- sustanza tat-test f'ħamrija partikolari, bħal ma huma l-ħamrija aċiduża tal-foresti, jew għal kimiċi ikkargati elettrostatikament, jista jkun meħtieġ li tintuża ħamrija addizzjonali.

1.6.3. **Il-ġbir u l-ħażna tal-kampjunu tal-ħamrija**

1.6.3.1. *Il-ġbir*

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-għalqa minn fejn il-ħamrija tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġitali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, żidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Is-sit magħżul għall-ġbir tal-ħamrija għandu jkun wieħed li jippermetti użu f'terminu twil. Mergħat permanenti, għelieqi b'uċuħ annwali taċ-ċereali (apparti mill-qamħ-ir-rum) jew dawk moghtija d-demel b'żergħat iffullata, huma tajbin. Il-għażla tas-sit tal-kampjunar m'għandhiex tkun ġiet trattata bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ għam mill-anqas sena qabel il-kampjunar. Ukoll, l-ebda fertilizzant organiku ma jkun ġie applikat għal mill-anqas sitt xhur. L-użu ta' fertilizzant minerali huwa aċċettabbli biss meta, b'konformità mal-ħtiġiet tal-kampjuni ta' l-uċuħ u tal-ħamrija, m'għandhomx ikunu miġbura għal mill-anqas tlett xhur wara l-applikazzjoni tal-fertilizzant. L-użu ta' ħamrija trattata bil-fertilizzanti li għandhom effetti bioċidali magħrufa (eż. is-sijanamid tal-kalċju) għandu jkun evitat.

Il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (itwal minn 30 jum) ta' nixfa jew ta' stgħadir bl-ilma. Għal ħamrija maħruta, il-kampjuni għandhom jinġabru minn fond ta' 1 sa 20 cm l-isfel. Għall art tal-mergħa (art fil-ħaxix) jew ħamrija oħra meta l-ħrit ma jseħħx, atul perijodi twal (f'mill-anqas staġun wieħed tat-tkabbir), il-fond massimu tal-kampjunar jista jkun kemm xejn aktar minn 20 cm (eż. sa 25 cm). Il-kampjuni tal-ħamrija għandhom ikunu ittrasportati bl-użu ta' kontenituri u skond kondizzjonijiet tat-temperatura li jiggarantixxu li l-propjetajiet inizjali tal-ħamrija ma jkunus sinifikament mibdula.

1.6.3.2. *Ħażna*

L-użu ta' ħamrija miġbura friska mill-għelieqi huwa ippreferut. Jekk ħażna fil-laboratorju ma tistgħax tkun evitata, il-ħamrija tista tkun maħżuna fid-dlam 4 ± 2 ºC għal massimu ta' tlett xhur. Matul il-ħażna tal-ħamrija, il-kondizzjonijiet erobiċi għandhom ikunu assigurati. Jekk il-ħamrija tkun miġbura minn żoni ta' fejn din tkun iffriżata għal mill-anqas tlett xhur tas-sena, il-ħażna għal sitt xhur fi – 18 ºC tista tkun ikkonsidrata. Il-biomassa mikrobjali tal-ħamrija maħżuna hija mkejla qabel kull esperiment u l-karbonju fil-biomassa għandu jkun mill-anqas 1 % tal-kontenut totali tal-karbonju organiku fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Tqandil u l-preparazzjoni tal-ħamrija għat-test**

1.6.4.1. *Pre-inkubazzjoni*

Jekk il-ħamrija kienet maħżunha (ara s-sezzjoni 1.6.4.2 u 1.7.1.3), pre-inkubazzjoni hija rakkommandata għal perijodu ta' bejn 2 u 28 jum. It-temperatura u l-umidità tal-kontenut tal-ħamrija matul il-pre-inkubazzjoni għandhom ikunu simili għal dik użata fit-test (ara s-sezzjonijiet 1.6.4.2 u 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Karatteristiċi fiżiko-kimiċi*

Il-ħamrija hija manwalment imnaddfa minn oġġeti kbar (eż. ġebel, partijiet ta' pjanti, eċċ.) u imbagħad magħrbla fin-nieda mingħajt tnixxif eċċessiv lejn daqs ta' partiċelli ta' anqas minn jew egwali għal 2 mm. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kampjun tal-ħamrija għandu jkun aġġustat b'ila distillat jew dejonizzat lejn valur ta' bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma.

1.6.5. **Preparazzjoni tas-sustanza tat-test għall-applikazzjoni mal-ħamrija**

Is-sustanza tat-test hija normalment applikata bl-użu ta' trasportatur. It-trasportatur jista jkun ilma (għal sustanzi li jinħallu fl-ilma) jew solidu inert bħal ma huwa ramel fin tal-kwartz (daqs tal-partiċella: 0,1 - 0,5 mm). Trasportaturi likwidi apparti mill-ilma (eż. solventi organiċi bħal ma huma l-aċetun, il-kloroforma) għandhom ikunu evitati la darba dawn jistgħu joħolqu ħsara għall-mikroflora. Jekk ir-ramel ikunu użat bħala trasportatur, dan jista jkun m iksi bis-sustanza tat-test imdewba jew sospiża f'solvent xieraq. F'tali każi, is-solvent għandu jkun imneħħi bl-evaporazzjoni qabel it-taħlit mal-ħamrija. Għall-aħjar distribuzzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħamrija, relattività ta' 10 g ramel ma kull kilogramma ta' ħamrija (piż xott) huwa rakkommandabbli. Kampjuni tal-kontroll huma ittrattati b'ammont ekwivalenti ta' ilmaa u/jew ramel kwartz biss.

Meta jkunu ittestjati kemikali volatili, it-telf matul it-trattament għandu jkun evitat sa kemm dan ikun possibbli u tentattiv għandu jsir sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja fil-ħamrija (eż. is-sustanza tat-test għandha tkun injettata fil-ħamrija minn diversi postijiet).

1.6.6. **Konċentrazzjonijiet tat-test**

Jekk il-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ jew kimiċi oħrajn b'konċentrazzjonijiet ambjentali prevedibbli huma ittestjati, mill-anqas żewġ konċentrazzjonijiet għandhom ikunu wżati. Il-konċentrazzjoni l-baxxa għandha tirrifletti mill-anqas l-ammont massimu mistenni li jilħaq il-ħamrija waqt kondizzjonijiet prattiċi, fil-waqt li l-konċentrazzjoni l-għolja għandha tkun mutiplu tal-konċentrazzjoni l-baxxa. Il-konċentrazzjonijiet ta' sustanza tat-test miżjuda mal-ħamrija huma ikkalkolati billi tkun preżunta inkorporazzjoni uniformi sa fond ta' 5 cm u l-massa tal-ħamrija f'densità ta' 1.5. Għall-agrokimiċi li huma applikati direttament mal-ħamrija, jew għal kimiċi li dwarhom il-kwantità li tilħaq il-ħamrija tista tkun prevista, il-konċentrazzjonijiet tat-test irrakkommandati huma l-massimu Predicted Environmental Concentration (PEC) (Konċentrazzjoni Ambjentali Mbassra) u ħames darbiet dik il-konċentrazzjoni. Is-sustanzi li huma mistennija li jkunu applikati diversi drabi mal-ħamrija fi staġun wieħed għandhom ikunu ittestjati fil-konċemntrazzjonijiet derivati mill-multiplikazzjoni tal-PEC bin-numru massimu antiċipat ta' l-applikazzjonijiet. L-għoila konċentrazzjoni ittestjata, b'dana kollu, m'għandhiex teċċedi għaxar darbiet il-massimu tar-rata ta' applikazzjoni waħda.

Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, serje ġeometrikuta' mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet għandu jkun użat. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda meħtieġa tal-valuri EC_x.

▼B

1.7. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.7.1. **Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.7.1.1. *It-trattament u l-kontrol*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża fi tlett porzjonijiet ta' piż egwali. Żewġ porzjonijiet huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih il-prodott, u l-ieħor huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-prodott (kontroll). Minimu ta' tlett repliki kemm għall ħamrija ittrattata u wkol mhux ittrattata huma rakkommandati. Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża f'sitt porzjonijiet ta' piż ugwali. Ħmasa mill-kampjunu huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih is-sustanza tat-test, u s-sitt kampjun huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-kimika. Tlett replikati taż-żewġ trattamenti u tal-kontroll huma rakkommandati. Attenzjoni għandha tingħata sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja tas-sustanza tat-test fil-kampjunu tal-ħamrija ittrattata. Matul it-taħlit, l-ikkumpattjar jew gerbubi mgħaqqda għandhom ikunu evitati.

1.7.1.2. *L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija*

L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija tista titwettaq b'żewġ modi: Bħala kampjuni fil-massa ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata jew f'serje ta' subkampjuni individwali u ta' daqs egwali ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata. B'dana kollu, meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali. Meta l-ħamrija tkun inkubata fil-massa, kwantitajiet kbar ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata huma ippreparati u s-sub-kampjuni għall-analiżi huma miġbura kif meħtieġ matul it-test. L- ammont inizjalment ippreparat għal kull trattament u kontroll jiddependi mid-daqs tas-sub-kampjuni, in-numru ta' repliki użati għall-analiżi u n-numru massimu antiċipat tal-ħinijiet tal-kampjunar. Il-ħamrija inkubata fil-massa għamndha tkun imħallta sewwa qabel is-sub-kampjuni. Meta l-ħamrija hija inkubata f'serje individwali ta' ħamrija, kull ħamrija ittrattata jew mhux trattata fil-massa hija diviża fin-numru meħtieġ ta' sub-kampjuni, u dawn huma utilizzati kif meħtieġ. Fl-esperimenti meta tnejn jew aktar drabi tal-kampjunar jistgħu ikunu antiċipati, sub-kampjuni biż-żejjed għandhom ikunu ippreparati sabiex iqisu ir-replikati kollha u l-waqtiet kollha tal-kampjunar. Mill-anqas tlett kampjuni tar-replikati tal-ħamrija tat-test għandhom ikunu inkubati permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi (ara s-sezzjoni 1.7.1.1). Matul it-testijiet kollha, kontenituri xierqa, bi spazju fil-wiċċ suffiċjenti, għandhom ikunu użati sabiex ikunu evitati l-kondizzjonijiet anerobiċi. Meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali.

1.7.1.3. *Il-kondizzjonijiet u t-tul tat-testijiet*

It-test huwa mwettaq fid-dlam f'temepratura tal-kamra ta' 20 ± 2 °C. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kamjuni tal-ħamrija għandu jkun miżmum matul it-test għal bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.4.2) b'medda ta' ± 5 %. Ilma distillat jew deonizzat jista jkun miżjud kif meħtieġ.

It-tul minimu tat-testijiet huwa 28 jum. Jekk agrokimiċi huma ittestjati, il-kantitajiet tad-diossidu tal-karbonju rilaxxat jew ta' lk-ossiġenu ikkunsmat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma paragunati. Jekk dawn ikunu differenti b'aktar minn 25 % fil-jum 28, it-test jitkompla sakemm differenza egwali għal, jew anqas minn 25 % tkun akkwistata, jew għal massimu ta' 100 jum, liema minnhom ikun l-aqsar. Għal dawk li ma humiex agrokimiċi, it-test ikun terminat wara 28 jum. Fil-jum 28, il-kwantitajiet tan-nitrat fil-kampjuni tal-ħamrija ittrattata jew tal-kontroll huma determinati u l-valuri EC_x ikunu ikkalkolati.

▼B

1.7.2. **Kampġjunaar u analiżi tal-ħamrija**

1.7.2.1. *Kampjunar skedat tal-ħamrija*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-kampjuni tal-ħamrija huma analiżżati għan-nitrat fil-jiem 0, 7, 14 u 28. jekk test imtawwal ikun meħtieġ, aktar kejl għandu jseħħ f'intervalli ta' 14-il jum, wara l-jum 28.

Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test huma wżati u l-kampjuni tal-ħamrija huma analiżżati għan-nitrat fil-bidu (jum 0) u fit-tmiem tal-perijodu ta' l-espożizzjoni (28 jum). Kejl intermedju, eż. fil-jum 7, jista jkun miżjud jekk dan ikun meqjus bħala meħtieġ. L-informazzjoni akkwistata fil-jum 28 hija użata għad-determinazzjoni tal-valux ECx dwar il-kimika. Jekk mixtieq, l-informazzjoni mill-jum 0 tal-kampjuni tal-kontroll jistgħu ikunu wżati sabiex jirraportaw il-kwanititá inizjali tan-nitrat fil-ħamrija (12).

1.7.2.2. *Kejl tar-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju*

L-ammont ta' nitrat iffurmat f'kull replika trattata jew tal-kontroll huwa determinat f'kull waqt tal-kampjunar. Il-kampjuni tal-ħamrija huma mħallta ma ammint suffiċjenti ta' glukożju sabiex iħeġġeġ reazzjoni immedjata ta' respirazzjoni massima. L-ammont ta' glukożju meħtieġ sabiex iħeġġeġ ir-reazzjoni respiratorja massima minn ħamrija partikolari jista jkun determinat b'test preliminarju li jutilizza serje ta' konċentrazzjonijiet ta' glukożju (14). B'dana kollu, għal ħamrija mrammla bi 0,5-1,5 % karbonju organiku, 2 000 mg sa 2 000 mg glukożju kull kg piż tal-ħamrija xotta huwa normalment suffiċjenti. Il-glukożju jistgħa jkun miħun fi trab mar-ramel kwarz nadif (10 gramel/kd piż tal-ħamrija xotta) u imħallta b'mod omoġeniku mal-ħamrija.

Il-kampjuni tal-ħamrija emendata bil-glukożju hija inkubata f'apparat xieraq għall-kejl tar-rati tar-respirazzjoni, jew kontinwament, kull siegħa, jew kull sagħtejn (ara s-sezzjoni 1.6.1) fi 20 ± 2 °C. Id-diossidu tal-karbonju rilaxxat jew l-ossiġenu ikkunsmat huwa mkejjel għal 12-il siegħa konsekuttivi u l-kejl għandu jibda malajr kemm jista jkun possibbli, i.w. fi żmien 1 sa 2 siegħat wara s-supplement tal-glukożju. Il-kwantitajiet totali tad-diossidu tal-karbonju rilaxxata jew l-ossiġenu ikkunsmat matul it-12-il siegħa huma mkejla u r-rati medja tar-respirazzjoni huma determinati.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'agrokimiċi, il-kwalità tad-diossidu tal-karbonju rilaxxat minn, jew l-ossiġenu ikkunsmat f'kull replika tal-kampjun tal-ħamrija għandha tkun irreġistrata, u l-valuri medji tar-replikati kollha għandhom ikunu ipprovduti f'għamla tabulari. Ir-riżultati għandhom ikunu evalwatu b'metodi statistiċi xierqa u ġeneralment aċċettabbli (eż. Test-F, 5 % livell sinifikanti). Ir-rati tar-respirazzjoni indotti bil-glukożju huma espressi fi mg diossidu tal-karbonju/kd piż tal-ħamrija xotta/siegħa jew mg ossiġenu/piż tal-ħamrija xotta/siegħa. Il-medja tar-rata tal-formazzjoni tad-diossidu tal-karbonju jew il-medja tar-rata tal-konsum ta' l-ossiġenu f'kull trattament huma mqabbla ma dawk tal-kontroll, u d-devjazzjoni perċentwali mill-kontroll hija ikkalakolata.

▼B

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'dawk li ma humiex agrokimiċi, il-kantità ta' nitrat iffurmat f'kull replika huwa determinat, u l-kurva doża-reazzjoni hija ippreparata għall-estimi tal-valuri EC_x Ir-rati tar-respirazzjoni indotta bil-glukożju (i.e. mg diossidu tal-karbonju/kg piż tal-ħamrija xotta.siegħa jew mg ossiġenu/piż tal-ħamrija xotta.siegħa) misjuba fil-kampjuni ittrattati wara 28 jum huma mqabbla ma dawk misjuba fil-kontroll. Minn din l-informazzjoni, il- % tal-valuri ta' l-inibizzjoni għal kull konċentrazzjoni tat-test huma ikkalkolati. Dawn il-persentaġġi huma mpinġija kontra l-konċentrazzjoni, u l-proċeduri statistiċi huma mbagħad użati għall-kalkolu tal-valuri EC_x. Limiti ta' l-affidabbilità (p = 0,95) għal EC_x ikkalkolati huma wkoll determinati bl-użu tal-proċeduri normali (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Meta r-riżultati mit-testijiet bl-agrokimiċi huma evalwati, u d-differenza fir-rati tal-formazzjoni tar-respirazzjoni bejn it-trattament baxx (i.e. il-massimu tal-konċentrazzjoni prevista) u l-kontroll tkun egwali għal, jew anqas minn 25 % fi kwalunkwe kampjun fil-waqt wara l-jum 28, il-prodott jista jkun evalwat bħala li jkollu infuwenza f'terminu fit-tul fuq it-trasformazzjoni tal-karbonju fil-ħamrija. Meta r-riżultati minn testijiet b'kimiċi apparti milli l-agrokimiċi huma evalwati, il-Valuri EC_{50}, EC_{25} u/jew EC_{10} huma wżati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

RAPPORTTAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Identifikazzjoni sħiħa tal-ħamrija użata, inkluż:

— refernza ġeografika tas-sit (latitudini, lonġitudini);

— informazzjoni dwar l-istorja tas-sit (i.e. il-koperta veġittiva, it-trattamenti bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ, trattamenti bil-fertilizzanti, kontaminazzjoni aċċidentali, eċċ.);

— is-sekwenza ta' l-użu (eż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.);

— il-fond tal-kampjunar (cm);

— il-kontenut ramel/ħama'/tafal (% tal-piż);

— pH (fl-ilma);

— kontenut karbonju organiku (% piż xott);

— kontenut tan-nitroġenu organiku (% piż xott);

— kapaċità ta' l-iskambju tal-jonju (mmol/kg);

— biomassa mikrobjali f'termini ta' persentaġġ tal-karbonju organiku totali;

— referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru;

— l-informazzjoni li tirrigwardja il-ġbir u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija;

— dettalji tal-pri-inkubazzjoni tal-ħamrija, jekk ikun hemm.

▼B

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;

— l-informazzjoni ta' l-identifikazzjoni kimika, meta relevanti, inkluża l-formula strutturali, il-purità (i.e. għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ il-persentaġġ ta' l- ingredjent attiv), il-kontenut tan-nitroġenu.

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji ta' l-emenda tal-ħamrija b'substrata organika;

— in-numru tal-konċentrazzjonijiet fil-kimika tat-test użata u, meta xieraq, ġustifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet magħżula;

— dettalji ta' l-applikazzjoni tas-substrata tat-test fil-ħamrija;

— temperatura ta' l-inkubazzjoni;

— il-kontenut ta' l-umidità fil-bidu u matul it-test;

— il-metodu użat ta' l-inkubazzjoni tal-ħamrija (i.e. bħala massa jew bħala serje ta' subkampjuni individwali);

— in-numru ta' replikati;

— id-drabi tal-kampjunar.

Riżultati:

— metodu u apparat użat għall-kejl tar-rati tar-respirazzjoni;

— dettalji tabulate, inklużi l-valuri individwali u medji għall-kwantitajiet tad- diossidu tal-karbonju jew ta' l-ossiġenu;

— il-varjazzjoni bejn ir-replikati fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll;

— spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet imwettqa fil-kalkoli, jekk relevanti;

— il-varjazzjoni perċentwali fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull waqt tal-kampjunar, jekk xieraq, il-limitu ta' l-affidibbilità tal-valur EC_5 b'95 fil-mija affidibbilità, EC_x oħrajn (i.e. EC_{25} jew EC_{10}) b'intervalli ta' l-affidibbilità, u grafika tal-kurva doża-reazzjoni;

— trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq;

— l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jkunu ta' għajnuna fl- interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in "Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in "Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph Nº 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. **TRASFORMAZZJONIEROBIKA UANEROBIKA FIL-ĦAMRIJA**

1. **METODU**

Dan il-Metodu tat-Test huwa replika għal OECD TG 307 (2002)

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-Metodu tat-test huwa ibbażat fuq linji ta' gwida eżistenti (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Dan il-metodu deskritt f'dan il-metodu tat-test huwa iddisinjat għall-evalwazzjoni tat-trasformazzjoni erobika u anerobika tal-kimiċi fil-ħamrija. L-esperimenti huma mwettqa sabiex ikun determinat (i) ir-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test, u (ii) in-natura u r-rata tal-formazzjoni u t-tnaqqis tat-traformazzjoni tal-prodotti li dwarhom il-pjanti u l-organiżmi fil-ħamrija jistgħu ikunu esposti. Tali studji huma meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati fil-ħamrija jew li huma pjuttost li jilħqu l-ambjent tal-ħamrija. Ir-riżultati ta' tali studji fil-laboratorju jistgħu wkoll ikunu wżati sabiex jiżviluppaw il-protokolli tal-kampjunar u ta' l-analiżi fl-oqsma ta' studju relatati.

L-istudji erobiċi u anerobiċi ma tip wieħed ta' ħamrija huma ġeneralment suffiċjenti għall-evalwazzjoni tal-passaġġi tat-trasformazzjoni (8) (10) (11). Ir-rati tat-trasformazzjoni għandhom ikunu determinati f'mill-anqas tlett ħamrija addizzjonali (8) (10).

Laqgħa ta' Ħidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Ħamrija/Sediment li nżammet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (10) qablet dwar in-numru u t-tip ta' ħamrija għall-użu f'dan it-test. It-tipi tal-ħamrija ittestjati għandhom ikunu rappreżentattivi tal-kondizzjonijiet ambjentali ta' fejn l-użu jew ir-rilaxx ikun sjjer iseħħ. Per eżempju, il-kimiċili jistgħu ikunu rilaxxati fi klimi subtropikali sa tropikali għandhom ikunu ittestjati bil-Ferrasoli jew in-Nitrasoli (sistema FAO). Il-Laqgħa ta' Ħidma kienet ukoll għamlet rakkommandazzjonijiet li jirrigawrjaw il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija, ibbażari fuq il-Linja ta' Gwida ISO (15). L-użu tal-ħamrija mistgħadra (tar-ross) hija wkoll ikkunsidrata f'dan il-metodu.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sustanza tat-test: Kwalunkwe sustanza, sew jekk kompost oriġinali jew il-prodotti relevanti tat-trasformazzjoni.

Prodotti tat-trasformazzjoni: Is-sustanzi kollha li jirriżultaw mir-reazzjonijiet tat-trasformazzjoni biotiċi jew abiotiċi tas-sustanza tat-test, inklużi il-CO2 u l-prodotti li huma marbuta mar-residwi.

"Residwi marbuta": "Residwi marbuta" tirrapreżemnta komposti fil-ħamrija, pjanti jew annimali, li jippersistu fil-matriċi fil-għamla ta' sustanza oriġinali jew tal-prodotti metaboliti/trasformazzjoni wara l-estrazzjoni. Il-metodu ta' l-estrazzjoni m'għandux sostanzjalment jibdel il-komposti nfushom jew l-istruttura tal-matriċi. In-natura tar-rabta tista tkun kjarifikata parzjalment bil-metodi ta' l-estrazzjoni tat-tibdil-tal-matriċi u b'tekniċi analitiċi sofistikati. Sal-lum, per eżempju, ir-rabtiet kovalenti joniċi u sorptivi, kif ukoll l-ingassar, kienu ġew identifikati b'dan il-mod. Ġeneralment, il-formazzjoni tar-residwi marbuta tnaqqas il-bioaċċessibbiltà u l-biodisponabbiltà sinifikament (12) (Modifikati minn IUPAC 1984 (13)).

Trasformazzjoni erobika: Reazzjonijiet li jseħħu fil-preżenza ta' l-ossiġenu molekulari (14).

▼B

Trasformazzjoni anerobika: Reazzjonijiet li jseħħu fl-esklużjoni ta' l-ossiġenu molekulari (14).

Ħamrija: Hija taħlita ta' kostitwenti kimiċi minerali u organiċi, dawn ta' l-aħħar ikun fihom komposti ta' kontenut għoli tal-karbonju u n-nitroġenu u ta' piżijiet molekulari għoljin, animali b'organiżmi żgħat (l-aktar mikro-). Il-ħamrija tista tkun imqandla f'żewġ stati:

(a) mhux disturbata, kif tkun żviluppat matul iż-żmien, f'saffi karatteristiċi tat-tipi tal-varjetà tal-ħamrija;

(b) disturbata, kif normalment tinsab f'għelieqi ħarratija jew kif isseħħ meta l-kampjuni huma miġbura bit-tħaffir u kif użata f'dan il-metodu ta' test (14).

Mineralizzazzjoni: Hija d-degradazzjoni kompleta ta' kompost organiku lejn CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, u CH_4, CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet anerobiċi. Fil-kuntest ta' dan il-metodu taa' test, meta kompost bit-tikketta-^{14}C ikun użat, il-mineralizzazzjoni tfisser dehradazzjoni estensiva li matulha atomu tal-karbonu ttikkettjat ikun ossidizzat bil-rilaxx ta' l-ammont xieraq ta' $^{14}CO_2$ (14).

Nofs-ħajja: $t_{0,5}$, huwa l-ħin meħtieġ għal 50 % trasformazzjoni tas-sustanza tat-test meta t-trasformazzjoni tista tkun deskritta bil-kinetiċi ta' l-ewwel ordni; din hija independenti mill-konċentrazzjoni.

DT_{50} (Għibien Ħin 50): Huwa l-ħin li fih il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 50 %; din hija differenti min-nofs-ħajja t0,5 meta t-trasformazzjoni ma tkunx issegwi il-kinetiċi ta' l-ewwel ordni.

DT_{75} (Għibien Ħin 75): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 75 %.

DT_{90} (Għibien Ħin 90): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 90 %.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu wżati għall-karetterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti bil-metodi spektroskopiċi u kromatografiċi.

1.4. L-APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

Il-metodu huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi kollha (mhux ittikkettjati jew radjotikkettjati) li dwarhom metodu analitiku b'eżattezza u sensittività suffiċjenti huma disponibbli. Dan huwa applikabbli għal komposti kemm xejn volatili, mhux volatili, li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. It-test m'għandux ikun applikat lejn kimiċi li huma ferm volatili minn ġewwa l-ħamrija (eż., fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistgħux jinżammu fil-ħamrija skond il-kondizzjonijiet sperimentali ta' dan it-test.

▼B

1.5. INFORMAZZJONI DWARIS-SUSTANZATAT-TEST

Sustanza tat-test mhux-ittikkettjata jew ittikkettjata tista tkun użata sabiex tkejjel ir-rata tat-trasformazzjoni. Il-materjal tikkettjat huwa meħtieġ għall-istudju tal-passaġġ tat-trasformazzjoni u sabiex ikun stabbilit il-bilanċ tal-massa. Tikkettjar-14C huwa rakkommandat imma l-użu ta' iżotopi oħrajn bħal ma huma ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, jistgħu wkoll ikunu utili. Sa kemm huwa possibbli, it-tikketta għandha tkun imqiegħda fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekolu ([1]) (10). Il-Purità tas-sustanza tat-test għandha tkun mill-anqas 95 %.

Qabel ma jitwettaq test dwar it-trasformazzjoni eronika u amerobika fil-ħamrija, l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test għandha tkun disponibbli.

(a) solubilità fl-ilma (il-Metodu A.6);

(b) solubilità f'solventi organiċi;

(ċ) pressjoni tal-fwar (il-Metodu A.4) u l-liġi kostanti Henry;

(d) il-koeffiċjent tal-qsim n–oktano/ilma (il-Metodu A.8);

(e) stabbilità kimika fid-dlam (idrolisi) (il-Metodu C.7);

(f) pKa jekk il-molekolu jkun probabbli għal protonazzjoni jew deportonazzjoni (OECD Linja ta' Gwida 112) (16).

Informazzjhoni utili oħra tista tinkludi dettalji dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test fuq il-mikro-organiżmi tal-ħamrija (il-Metodi tat-Testijiet C.21 u C.22) (16).

Il-metodi analitiċi (inklużi l-metodi ta' l-estrazzjoni u tat-tindif) għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tat-traformazzjoni tal-prodotti tagħha, għandhom ikunu disponibbli.

1.6. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-kampjuni tal-ħamrija huma ittrattati bis-sustanza tat-test u inkubati fid-dlam f'garafini tat-tip biometriċi jew f'sistemi ta' nixxija kontinwa skond il-kondizzjonijiet kontrollati tal-laboratorju (f'temepratura u l-umidità tal-ħamrija kostanti). Wara intervalli ta' ħin xieraq, il-kampjuni tal-ħamrija huma estratti u analizzati mis-sustanza oriġinali u għall-prodotti tat-trasformazzjoni. Prodotti volatili huma wkoll, miġbura għall-analiżi bl-użu ta' apparati xierqa ta' l-assorbazzjoni. Bl-użu tal-materjal ittikkettjat-^{14}C, ir-rati varji tal-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test jistgħu ikunu mkejla bin-nassa evoluta $^{14}CO_2$ u l-bilanċ tal-massa, inkluża l-formazzjoni ta' residwi marbuta mal-ħamrija, jisgħu ikunu stabbiliti.

1.7. KRITERJI TAL-KWALITÀ

1.7.1. **Irkupru**

L-estrazzjoni u l-analiżi ta', mill-anqas, nofs il-kampjunu duplikati tal-ħamrija, wara ż-żieda tas-sustanza tat-test, tagħti l-ewwel indikazzjoni tar-repetabbiltà tal-metodu nalitiku u ta' l-uniformità tal-proċedura ta' l-applikazzjoni għas-sustanza tat-test. L-irkupri fi stadji aktar tard ta' l-esperimenti huma mogħtija bil-bilanċi rispettivi tal-massa. L-irkupri għandhom ikunu fil-medda ta' minn 90 % sa 110 % tal-kimiċi ittikkettjati (8) u minn 70 % sa 110 % għal kimiċi mhux ittikkettjati (3).

([1]) Per eżempju, jekk is-sustanza għat-test ikun fiha ċirku wieħed. L-ittikkettjar fuq dan iċ-ċriku huwa meħtieġ. Jekk is-sustanza għat-test ikun fiha żewġ ċrieki jew iktar, studji separati jistgħu jkunu meħtieġa biex tiġi evalwata x-xorti ta' kull ċirku ttikkettjat u biex tinkiseb informazzjoni adattata dwar il-formazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni.

▼B

1.7.2. **Ir-repettabbiltà u s-sensittività tal-metodu analitiku**

Ir-repetabbilità tal-metodu analitiku (eskluża l-peffiċjenza ta' l-estrazzjoni inizjali) sabiex tkun kwantifikata s-sustanza tat-test u tat-trasformazzjoni tal-prodotti tista tkun verifikata b'analiżi dupplikata ta' l-istess estratt tal-ħamrija, inkubat għal tul ta' żmien biżżejjed għall-formazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti.

Il-limitu ta' sejbien (limit of detection (LOD)) tal-metodu analitiku għas-sustanza tat-test u għat-trasformazzjoni tal-prodotti għandu jkun mill-anqas 0,01 mg.kg-1 ħamrija (bħala sustanza tat-test) jew 1& tad-doża applikata, liema minnhom hija l-anqas. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni (limit of quantification (LOQ)) għandu wkoll ikun speċifikat.

1.7.3. **L-eżatezza tad-dettalji tat-trasformazzjoni**

Analiżi regressiva tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-ħin, tagħti informazzjoni xierqa dwar l-affiddabbilità tal-kurva tat-trasformazzjoni u tippermetti il-kolkolu tal-limiti affidabbli ta' nofs-ħajjiet (fil-każ ta' psewdo kinetiċi ta' l-ewwel ordni) jew il-valuri DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90}.

1.8. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.8.1. **Apparat u reaġenti kimiċi**

Is-sistemi ta' l-inkubazzjoni jikkonsistu minn sistemi statiċi magħluqa jew sistemi xierqa ta' nixxija kontinwa (7)(17). Eżempji ta' l-apparat xieraq ta' nixxija kontinwa fil-ħamrija u l-garafina tat-tip-biometriku huma murija fil-Fihuri 1 u 2, rispettivament. Iż-żewġ tipi tas-sistemi ta' l-inkubazzjoni għandhom vantaġġi u limitazzjonijiet (7)(17).

Apparat normali tal-laboratorju huwa meħtieġ, u speċjalment dan li ġej:

— Strumenti analitiċi bħal ma huma l-apparat GLC, HPLC, TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' sejbien għall-analiżi ta' sustanzi radjo-tikketta jew mhux-tikketta jew metodu tat-trattib ta' l-iżotopi inversi;

— Strumenti għall-iskopijiet ta' l-identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);

— Strument ta' l-għadd tal-likwidu xintillanti;

— Ossidizzatur għall-kombustjoni tal-materjal radjo-attiv;

— Ċentrifuga;

— Apparat ta' l-estrazzjoni (per eżempju, tubi taċ-ċentrifuga għal estrazzjoni fil-kiesaħ u apparat Soxhlet għal estrazzjoni kontinwa taħt ir-refluss);

— Strumentazzjoni għall-konċentrazzjoni tat-taħlitiet u l-estratti (eż. evaporator rotanti);

— Banju ta' l-ilma;

— Apparat mekkaniku tat-taħlit (eż. maagna li tagħġen, ħallati rotanti).

▼B

Ir-reaġenti kimiċi użati jinklusu, per eżempju:

— NaOH, grad analitiku, 2 mol. dm^{-3}, jew bażi oġra xierqa (eż. KOH, ethanolamine);

— H_2SO_4, grad analitiku, 0,05 mol. dm^{-3};

— Ethylene glycol, grad analitiku;

— aterjali solidi ta' l-assorbazzjoni bħal ma huma l-ġir tas-soder u l-buqi tal-polyurethane;

— Solventi organiċi, grad analitiku, bħal ma hu l-aċetun, il-metanol, eċċ.;

— Likwidu tax-xintillazzjoni.

1.8.2. **L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test**

Għal żieda ma, u d-distribuzzjoni fil-ħamrija, is-sustanza tat-test tista tkun imdewwba fl-ilma (deonizzat jew distillat) jew, meta meħtieġ, f'ammonti minimi ta' aċetun jew solventi organiċi oħrajn (6) li fihom is-sustanza tat-test tkun tinħall u stabbli b'mod suffiċjenti. B'dana kollu, l-ammont ta' solvent magħżul m'għandux ikollu influwenza sinifikanti fuq l-attività mikrobjali tal-ħamrija (ara s-sezzjonijiet 1.5 u 1.9.2-1.9.3) L-użu ta' solventi li jfixklu l-attività mikrobjali, bħal ma huma l-kloroform, id-diklorometanju u solventi ħaloġenizzati oħrajn, għandu jkun evitat.

Is-sustanza tat-test tista wkoll tkun miżjuda bħala solidu, eż. mħallta mar-ramel kwatrz (6) jek f'test żgħir ta' sub-kampjun tal-ħamrija li tkun ġiet imnixxfa fl-arja u sterilizzata. Jekk is-sustanza tat-test hija miżjuda bl-użu ta' solvent, is-solvent għandu jkun imġolli li jevapora qabel ma s-sub-kampjun hekk miżjud ikun imħallat mal-kampjun oriġinali mhux-sterili tal-ħamrija.

Għal kimiċi ġenerali, li r-rotta maġġura tad-dħul tagħhom fil-ħamrija hija matul l-applikazzjoni tal-ħama' tad-drenaġġ/mill-ħmieġ ta' l-annimali, is-sustanza tat-test għandha l-ewwel tkun miżjuda mal-ħama' li imbagħad tkun miżjuda mal-kampjun tal-ħamrija. (ara s-sezzjonijiet 1.9.2 u 1.9.3)

L-użu ta' prodotti formulati mhux, bħala rutina, rakkommandat. B'dana kollu, eż. għal sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu, l-użu ta' materjal; formulat jista jkun alternattiva xierqa.

1.8.3. **Il-ħamrija**

1.8.3.1. *L-għażla tal-ħamrija*

Għad-determinazzjoni tal-passaġġ tat-trasformazzjoni, ħamrija rapreżentattiva tista tkun użata' ħamrija grassa mrammla jew ħamrija grassa bil-ħama' jew ħamrija grassa jew ramel grass (skond il-klassifikazzjoni FAO u USDA 18) bi pH ta' 5,5-8,0, kontenut karboniku organiku ta' 0,5-2,5 % u biomassa mikrobjali ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali hija rakkommandata (10).

Għall-istudji tar-rata tat-trasformazzjoni mill-anqas tlett żidiet tal-ħamrija għandhom ikunu wżati li jirrapreżentaw medda ta' ħamrija relevanti. Il-ħamrija għandha tvarja fil-kontenut karboniku organiku, pH, kontenut tat-tafal u l-biomassa mikrobjali (10).

▼B

Il-ħamrija kollha għandha tkun karatterizzata, mill-anqas, għal tiswir (% ramel, % ħama', % tafal) (skond il-klassifikazzjoni FAO u ESDA (18)), pH, kapaċità ta' skambju tal-jonji, karbonju organiku, densità tal-massa, karatteristiċi taż-żamma ta' l-ilma [2] ([1]) u l-bijomassa mikrobjali (biss għal studju erobiċi). Informazzjoni addizzjonali dwar il-propjetajiet tal-ħamrija jistgħu ikunu utili fl-interpretazzjoni tar-riżultati. Għad-determinazzjoni tal-karatteristiċi tal-ħamrija, il-metodi rakkommandati fir-referenzi (19) (20) (21) (22) (23) jistgħu ikunu wżati. Il-bijomassa mikrobjali għandha tkun determinata bl-użu tar-respirazzjoni indotta-fis-sub-strata (substrate-induced respiration (SIR)) il-metodu (25) (26) jew metodi alternattivi (20).

1.8.3.2. *Ġbir, tqandil, u l-ħażna tal-ħamrija*

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-għalqa minn fejn il-ħamrija tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġetali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, żidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Jekk il-ħamrija tkun ġiet ittrattata bis-sustanza tat-test jew bl-analogi strutturali tagħha matul l-erba' snin preċedenti, dawn m'għandhomx ikunu użati għall-istudji tat-trasformazzjoni (10) (15).

Il-ħamrija għandha tkun miġbura friska mill-għalqa (mill-orizzont A jew mis-saff tal-wiċċ f'20 cm) b'kontenut ta' l-ilma fil-ħamrija li jiffaċilita l-għarbiel. Għal ħamrija oħra apparti milli dik mistgħadra, il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (> 30 jum) ta' nixfa, ġlata jew mifqugħa bl-ilma (14). Il-kampjuni għandhom ikunu trasportati b'manjera li tnaqqas it-tibdiliet fil-kontenut ta' l-ilma fil-ħamrija u għandhom jinżammi fid-dlam b'aċċess liberu ta' arja, kemm jista jkun possibbli. Borża tal-plastik, kemm xejn marbuta, hija ġeneralment adekwata għal dan l-iskop.

Il-ħamrija għandha tkun proċessata malajr kemm jista jkun possibbli wara l-kampjunar. Veġitazzjoni, fawna kbira tal-ħamrija u ġebel għandhom ikunu mneħħija qabel ma l-ħamrija tkun mogħddija minn għarbiel ta' 2 mm li jneħħli ġebel żgħar, fawna u l-frak tal-pjanti. Tnixxif estensiv u t-tisħiq tal-ħamrija, qabel l-għarbiel, għandhom ikunu evitati (15).

Meta il-kampjunar fil-għalqa jkun diffiċli fix-xitwa (il-ħamrija iffriżta jew koperta f'saffi ta' borra), din għandha tinġabar mil-ħamrija tal-lott maħżuna f'serra b'koperta ta' pjanti (eż. ħaxix jew taħlita ta' ħaxix u silla) L-istudji bil-ħamrija miġbura friska mill-għalqa huma ferm prefereuti, imma jekk il-ħamrija miġbura u ipproċessata ikunu tiġi maħżuna qabel il-bidu ta' l-istudju, il-kondizzjonijiet tal-ħażna għandhom ikunu adekwati u biss għal-limitu ta' żmien (4 ± 2 °C għal massimu ta' tlett xhur) sabiex jinżamm l-attività mikrobjali ([2]) 1. Struzzjonijiet dettaljati dwar il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-ħamrija, li għandha tkun użata fl-esperimenti tal-biotrasformazzjoni, jistgħu jinstabu fi (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) Il-karatteristika tar-ritenzjoni ta' l-ilma fil-ħamrija tista' titkejjel bħala *field capacity*, bħala kapaċità taż-żamma ta' l-ilma jew bħala *water suction tension (pF)*. Għall-ispjegazzjoni ara Anness 1. Għandu jiġi r-rappurtat fir-rapport ta-test jekk il-karatteristiċi tar-ritenzjoni ta' l-ilma u d-densità goffa tal-ħamrija ġew determinati fil-kampjuni ta' l-għelieqi *not disturbed* jew f'kampjuni *disturbed* (proċessati).

([2]) Recent research results indicate that soils from temperate zones can also be stored at –20 °C for more than three months (28)(29) without significant losses of microbial activity.

▼B

Qabel ma l-ħamrija ipproċċessata tkun użata f'dan it-test, din għandha tkun l-ewwel inkubata sabiex tippermetti l-ġerminazzjoni u t-tneħħija taż-żrieragħ, u sabiex ikun stabbilit mill-ġdid l-ekwilibriju tal-metaboliżmu mikrobjali bħala segwiment tal-kambju mill-kampjunar jew mill-kondizzjonijiet tal-ħażna lejn il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni. Perijodu ta' qabel l-inkubazzjoni ta' bejn 2 u 28 jum, li jqarreb it-temperatura u l-kondizzjonijiet ta' l-umidità tat-test attwali huma ġeneralment adekwati (15).Iż-żmien tal-ħażna u ta' qabel l-inkubazzjoni, flimkien, m'għandhomx jeċċedu t-tlett xhur.

1.9. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.9.1. **Kondizzjonijiet tat-test**

1.9.1.1. *Temperatura tat-test*

Matul il-perijodu kollu tat-test, il-ħamrija għandha tkun inkubata fid-dlam f'temperatura kostanti li tirrapreżenta l-kondizzjonijiet klimatiċi ta' fejn l-użu jew ir-rilaxx ikun sejjer iseħħ. Temperatura ta' 20 ± 2 °C hija rakkommandata għas-sustanzi kollha tat-test li jistgħu jilħqu t-temperatura klimatika tal-ħamrija. It-temperatura għandha tkun sorveljata.

Dwar il-kimiċi applikati jew rilaxxati fi klimi kesħin (eż. pajjiżi tat-tramunta, matul il-perijodi tal-ħarifa/xitwa), kampjuni addizzjonali tal-ħamrija għandhom ikunu inkubati imma f'temperatura aktar baxxa (eż. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Il-kontenut ta' l-umidità*

Għat-testijiet tat-trasformazzjoni permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, il-kontenut ta' l-umidità tal-ħamrija ([1]) 2għandu jkun aġġustat lejn u miżmum fi pF bejn 2,0 u 2,5 (3). Il- kontenut ta' l-umidità fil-ħamrija huwa espress bħala massa ta' l-ilma għal kull massa ta' ħamrija xotta u għandu jkun ikkontrollat regolarment (eż. f'intevalli ta' ġimgħatejn) bl-użin fil-garafini ta' l-inkubazzjoni u t-talf ta' l-ilma kumpensdat biż-żieda ta' l-ilma (preferibbilment ilma tal-vit sterilizzat mill-filtru). Attenzjoni għandha tingħata sabiex ikunu prevenuti jew minimizzati t-telf tas-sustanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni bil-volatilizzazzjoni u/jew il-fotodegradazzjoni (jekk ikun hemm) matul iż-żieda ta' l-umidità.

Għat-testijiet tat-trasformazzjoni fil-kondizzjonijiet anerobiċi u mistgħadra, il-ħamrija tkun saturata bl-ilma mfawwar.

1.9.1.3. *Kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni erobika*

Fis-sistimi tan-nixxija kontinwa, il-kondizzjonijiet erobiċi ikunu miżmuma bit-tlaħliħ intermittenti jew bil-ventilazzjoni kontinwa b'arja umidifikata. Fil-garafini biometriċi, skambju ta' l-arja jkun miżmum b'diffużjoni.

1.9.1.4. *Kondizzjonijiet erobiċi sterili*

Sabiex tkun akkwistat l-informazzjoni dwar ir-releavanza tat-trasformazzjon abjotika tas-sustanza tat-test, kampjunu tal-ħamrija jistgħu ikunu sterilizzati (għall-metodi ta' l-isterilizzazzjoni ara r-referenzi 16 u 29), ittrattati bis-sustanza sterili tat-test (eż. żieda ta' taħlita matul filtru sterili) u mogħtija l-arja bl-użu ta' arja sterili umidifikata kif deskritt fis-sezzjoni 1.9.1.3, Għal ħamrija mistgħadra, ħamrija u ilma għandhom ikunu sterilizzati u l-inkubazzjoni għandha tkun imwettqa kif deskritt fis-sezzjoni 1.9.1.6.

([1]) Il-ħamrija la għandha tkun imxarrba wisq u lanqas niexfa wisq sabiex tinżamm l-*aeration* adegwata u n-nutrizzjoni tal-ħamrija *microflora*. Kontenuti ta' umdità rakkomandati għall-medda tat-tkabbir mikrobbjali ottimali minn 40-60 % il-kapaċità taż-żamma ta' l-ilma (WHC) u minn 0,1-0,33 bar (6). Il-medda ta' l-aħħar hija ekwivalenti għall-medda pF-ta' 2,0 – 2,5. Il-kontenuti ta' umdità tipiċi ta' tipi varji ta' ħamrija huma mogħtija f'Anness 2.

▼B

1.9.1.5. *Kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni anerobika*

Sabiex ikunu stabbiliti l-kondizzjonijiet amerobiċi, il-ħamrija ittrattata mis-sustanza tat-test u unkubata fil-kondizzjonijiet erobiċi għal 30 jum jew għal "nofs-ħajja" waħda jew DT_{50} (liema minnhom ikun l-iqsar) hija mbagħad mistgħadra fl-ilma (saff ta' 1-3 cm ilma) u s-sistema ta' l-inkubazzjoni mlaħilħa b'gass inert (eż. nitroġenu jew argonu) ([1]) 3. Is-sistema tat-test għandha tippermetti l-kejl bħal ma huma pH, konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu u l-potenzal redox u tinkludi l-apparati tan-nassa għal prodotti volatili. Sistema tat-tip biometrika għandha tkun magħluqha sabiex tevita id-dħul ta' l-arja bid-diffużjoni.

1.9.1.6. *Kondizzjonijiet ta' l-ikubazzjoni fil-mistgħadar*

Sabiex tkun studjata t-trasformazzjoni tal-ħamrija fl-għelieqi mistgħadra tar-ross, il-ħamrija tkun mifquha fl-ilma b'saff ta' madwar 1-5 cm u s-sustanza tat-test tkun applikata mal-fażi ta' l-ilma (9). Ħamrija b'fond ta' mill-anqas 5 cm hija rakkomandabbli. Is-sistema hija ventilata bl-arja permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, il-pH, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu u l-potenzal tar-redox fis-saff akweju għandhom ikunu sorveljati u irraportati. Perijodu ta' pre-inkubazzjoni ta' mil anqas ġimgħatejn huwa meħtieġ qabel ma jibdew l-istudji tat-trasformazzjoni (ara s-sezzjoni 1.8.3.2).

1.9.1.7. *It-tul tat-test*

Ir-rata u l-passaġġ ta' l-istudji għandhom normalment ma jeċċedux 120 jum ([2]) 4(3) (6) (8), minħabba li wara dan, tnaqqis fl-attività mikrobjali tal-ħamrija mal-mogħdija taż-żmien tkun mistennija f'sistema artifiċjali tal-laboratorju li tkun iżolata mit-tiġdid naturali. Meta meħtieġ għall-karatterizzazzjoni tat-tnaqqis fis-sustanza tat-test u fil-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri, l-istudji jistgħu ikomplu għal perijodi itwal (eż. 6 jew 12 il-xahar) (8). Perijodi itwal ta' inkubazzjoni għandhom ikunu ġustifikati fir-rapport tat-test u akkumpanjati bil-kejl tal-biomassa matul u fit-tmiem ta' dawn il-perijodi.

1.9.2. **It-twettieq tat-test**

Madwar 50 sa 200 g ħamrija (piż xott bażiku) ikun imqiegħed f'kull garafina ta' l-inkubazzjoni (ara l-Figuri 1 u 2 fl-AŻnness 3) u l-ħamrija ittrattata bis-sustanza tat-test b'wieħed mill-metodi deskritti fis-sezzjoni 1.8.2. Meta s-solventi organiċi huma wżati għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, dawn għandhom ikunu mneħħija mill-ħamrija bl-evaporazzjoni. Il-ħamrija tkun kompletament imħallta bi spatula u/jew biċ-ċekċik tal-garafina. Jekk l-istudju jkun imwettaq fil-kondizzjonijiet ta' għalqa mistgħadra, il-ħamrija u l-ilma għandhom ikunu mħallta sewwa wara l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Siltiet żgħar (eż. 1 g) tal-ħamrija ittrattata għandhom ikunu analizzati għas-sustanza tat-test sabiex tkun verifikata distribuzzjoni uniformi. Għal metodu alternattiv, ara hawn taħt.

([1]) Il-kundizzjonijiet ajrobiċi huma dominanti fil-ħamrija tal-wiċċ kif ukoll fis-*sub-surface* tal-ħamrija kif jidher fil-proġett ta' riċerka sponsorjat mill-UE. [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Il-kundizzjonijiet ajrobiċi jistgħu jseħħu biss okkażjonalment meta il-ħamrija tinfaqa' bl-ilma wara xita qawwija jew meta jkun hemm kundizzjonijiet ta' ross li għadu fil-ħliefa fl-għelieqi tar-ross.

([2]) L-istudji ajrobiċi jistgħu jintemmu ħafna qabel 120 jum sakemm l-*ultimate transformation pathway* u l-*ultimate mineralisation* jintlaħqu tajjeb sa dak iż-żmien. It-terminazzjoni tat-test hija possibbli wara 120 jum, jew meta mill-inqas 90 % tas-sustanza għat-test jiġi trasformat, iżda biss jekk mill-inqas 5 % CO_2 jiġi ffurmat.

▼B

It-trattament għandu jkun jikkorrespondi għall-għola rata ta' l-applikazzjoni tal-prodott għall-protezzjoni ta' l-uċuħ kif rakkommandat fl-istruzzjonijiet ta' l-użu u l-inkorporazzjoni uniformi sa fond xieraq fil-għalqa (eż. is-saff ta' fuq,10 cm [1] 5 tal-ħamrija). Per eżempju, għall-kimiċi tat-tħaddir jew tal-ħamrija applikati mingħajr inkorporazzjoni, il-fond xieraq għall-kalkolazzjoni ta' kemm kimika għandha tkun miżjuda ma kull garafina huwa 2,5 cm. Għal ħamrija inkorporata bil-kimiċi, il-fond xieraq huwa l-fond ta' l-inkorporazzjoni speċifikat fl-istruzzjonijiet ta' l-użu. Għal kimiċi ġenerali, ir-rata ta' l-applikazzjoni għandha tkun ikkalkolata fuq il-bażi tar-rotta l-aktar relevanti tad-dħul; per eżempju, meta r-rotta ewlenija tal-dħul fil-ħamrija hija mil-ħama' tad-drenaġġ, il-kimika għandha tkun dożata fil-ħama' f'konċentrazzjoni li tirrefletti l-konċentrazzjoni mistennija tal-ħama' u l-ammont ta' ħama' miżjud mal-ħamrija għandu jirrefletti t-tgħabija normali tal-ħama' mal-ħamrija agrikola. Jekk din il-konċentreazzjoni ma tkunx għola biżżejjed sabiex tidentifika l-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni, inkubazzjoni separata tal-kampjunu tal-ħamrija li jkun fiha rati għoljinm jista jkun ta' għajnuna, imma rati eċċessivi li jinfluwenzaw il-funzjonijiet mikrobjali għandhom ikunu evitati (ara s-sezzjonijiet 1.5 u 1.8.2).

B'mod alternattiv, lott kbit (i.e. 1 sa 2 kg) ta' ġamrija jista jkun ittrattat bis-sustanza tat-test, imħalta bil-galbu f'magna xierqa tat-taħlit u imbagħad trasferita f'porzjonijiet żgħat ta' 50 sa 200 g fil-garafini ta' l-inkubazzjoni (per eżempju bl-użu tal-qsim tal-kampjun). Siltiet żgħar (eż. 1 g) tal-ħamrija ittrattata għandhom ikunu analizzati għas-sustanza tat-test sabiex tkun verifikata distribuzzjoni uniformi. Tali proċedura hija preferibbli la darba tippermetti għal aktar distribuzzjoni uniformi tas-sustanza tat-test fil-ħamrija.

Ukoll, kampjuni mhux trattati huma inkubati permezz ta' l-istess kondizzjonijiet (erobiċi) bħall-kampjuni trattati bis-sustanza tat-test. Dawn il-kampjuni huma wżati għall-kejl tal-biomassa matul u fit-tmiem ta' l-istudji.

Meta s-sustanza tat-test hija applikata mal-ħamrija mdewwba fl-solvent(i) organiċi, kampjuni tal-ħamrija ittrattat bl-istess ammont ta' solvent(i) huma inkubati bl-istess kondizzjonijiet (erobiċi) bħall-kampjuni ittrattati bis-sustanza tat-test. Dawn il-kampjuni huma wżati għall-kejl tal-biomassa, inizjalment, matul u fit-tmiem ta' l-istudji sabiex jivverifikaw l-effetti tas-solvent(i) fuq il-biomassa mikrobjali.

Il-garafini li jkun fihom ħamrija ittratta huma jew imwaħħla mas-sistema tan-nixxija kontinwa deskritta fil-Figura 1 jew magħluqa mal-kolobba ta' l-assorbozzjoni murija fil-Figura 2 (ara l-Anness 3).

([1]) Il-kalkolu tal-konċentrazzjoni inizjali fuq *area basis* bl-użu ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d\left[kg_{soil}/m^3\right]}$$

C_{soil} = Il-konċentrazzjoni inizjali fil-ħamrija [$mg.kg^{-1}$]

A = Ir-rata ta' applikazzjoni [$kg.ha^{-1}$]; l = il-ħxuna tas-saff ta' ħamrija ta' l-għalqa [m]; d = *dry bulk* density tal-ħamrija [$kg.m^{-3}$].

Bħala regola, rata ta' applikazzjoni ta' 1 $kg.ha^{-1}$ tirriżulta f'konċentrazzjoni ta' ħamrija ta' bejn wieħed u ieħor 1 $mg.kg^{-1}$ f'saff ta' 10 cm (jekk tassumi *bulk density* ta' 1 g . cm^{-3}).

▼B

1.9.3. **Kampjunar u kejl**

Garafini doppji ta' l-inkubazzjoni huma mneħħija fl-intervalli xierqa tal-ħin u l-kampjuni tal-ħamrija estratti bis-solventi xierqa ta' polarità differenti u analizzati għas-sustanza tatA = Ir-rata ta' applikazzjoni [kg.ha^{-1}]; l = il-ħxuna tas-saff ta' ħamrija ta' l-għalqa [m]; d = *dry bulk density* tal-ħamrija [kg.m-^{3}]. Bħala regola, rata ta' applikazzjoni ta' 1 kg.ha^{-1} tirriżulta f'konċentrazzjoni ta' ħamrija ta' bejn wieħed u ieħor 1 mg.kg^{-1} f'saff ta' 10 cm (jekk tassumi *bulk density* ta' 1 g . cm^{-3}). test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni. Studju iddisinjat sewwa jinkludi garafini suffiċjenti hekk li żewġ garafini jkunu sagrifikati f'kull darba tal-kampjunar. Ukoll, it-taħlitiet ta' l-assorbazzjoni jew il-materjali solidi ta' l-assorbazzjoni ikunu mneħħija f'intervalli varji tal-ħin (intervalli ta' sebat ijiet matul l-ewwel xhar u intervalli ta' 17 il-jum wara xhar) matul u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni ta' kull kampjun tal-ħamrija, u analizzati għall-prodotti volatili. Apparti mil-kampjun tal-ħamrija miġbur direttament wara l-applikazzjoni (jum 9 tal-kampjunar) mill-anqas 5 punti addizzjonali tal-kampjunar għandhom ikunu nklużi. L-intervalli taż-żmien għandhom ikunu magħżula b'tali mod li l-għamla tat-tnaqqis tas-sustanza tat-test u l-għamla tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni jistgħu ikunu stabbiliti (eż. 0, 1, 3, 7 tijiem; 2, 3 ġimgħat; 1, 3, 3 xhur, eċċ.).

Meta jsir użu mis-sustanza tat-test tikkettjata-^{14}C, radjoattività mhux-estrattibbli tkun kwantifikata bil-kombustjoni u l-bilanċ tal-massa tkun ikkalkolata għal kull intervall tal-kampjunar.

Fil-każ ta' l-inkubazzjoni anerobika u mistgħadra, il-fażijiet tal-ħamrija u ta' l-ilma huma analizzati flimkien għas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni jew separatament bil-filtrazzjoni jew biċ-ċentrifugazzjoni qabel l-estrazzjoni u l-analiżi.

1.9.4. **Testijiet Opzjonali**

L-istudju erobiċi, mhux-sterili, f'temperaturi addizzjonali u umidità tal-ħamrija, jistgħu ikunu utili għall-kalkolu ta' l-influwenza tat-temperatura u l-umidità tal-ħamrija fuq ir-rati tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha fil-ħamrija.

Aktar karatterizzazzjoni tar-radjoattività mhux-estrattibbli tista tkun ipprovata bl-użu ta', per eżempju, estrazzjoni superfiċjali likwida.

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

L-ammonti tas-sustanza tat-test, tal-prodotti tat-trasformazzjoni, is-sustanzi volatili (fi % biss) u huma mhux-estrattibbli għandhom ikunu murija bħala % tal-konċentrazzjoni inizjalment applikata u, meta xieraq, bħala mg.kg^{-1} ħamrija (ibbażata fuq il-piż tal-ħamrija xorra) għal kull interval tal-kampjunar. Bilanċ tal-massa għandu jkun muri f'persentaġġ tal-konċentrazzjoni inizjalmeent applikata għal kull intervall tal-kampjunar. Preżentazzjoni grafika tal-konċentrazzjonijiet tas-susstanza tat-test kontra ż-żmien tkun tippermetti kalkolu tan-nofs-ħajja tat-trasformazzjoni tagħha jew DT_{50}. Prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri għandhom ikunu identifikati u l-konċentrazzjonijiet tagħhom għandhom ukoll ikunu pinġuti kontra ż-żmien sabiex juru r-rati tal-formazzjoni t-tnaqqis tagħhom. Prodott ta' trasformazzjoni maġġuri huwa kwalunkwe prodott li jirrapreżenta = 10 % tad-doża applikataa fi kwalunkwe waqt matul l-istudju.

Il-prodotti volatili kin ingastati jagħtu xi indikazzjoni tal-potenzal volatili ta' sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha mill-ħamrija.

▼B

Determinazzjonijiet aktar eżatti ta' nofs-ħajja jew tal-valuri DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90} għandhom ikunu akkwistati bl-applikazzjoni xierqa tal-kalkoli bil-mudell kinetiku. Il-valuri ta' nofs-ħajja u DT_{50} għandhom ikunu irrappurtati flimkien mad-deskrizzjoni tal-mudell użat, l-ordni tal-kinetiċi u l-koeffiċjent tad-determinazzjoni (r^2). Kinetiċi ta' l-ewwel ordni huwa preferutu, sakemm $r^2 < 0,7$. Jekk xieraq, il-kalkoli għandhom ukoll ikunu applikati għall-prodotti magġuri tat-trasformazzjoni. Eżempji ta' mudelli xierqa huma deskritti fir-referenzi 31 sa 35.

Fil-każ ta' studji ta' rati mwettqa f diversi temperaturi, ir-rati tat-trasformazzjoni għandhom ikunu deskritti bħala funzjoni tat-temperatura fi ħdan il-medda tat-temperatura sperimentali bl-użu tar-relazzjoni Arrhenius, bil-formula:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

Meta ln A u B huma kostanti regrassivi mill-inteċessjoni u ż-żurżieqa, rispettivament, tal-linja ta' l-aħjar posizzjoni ġenerata minn regressjoni lineari ln k kontra 1/T, k hija r-rata kostanti fit-temperatura t u T hija t-temperatura fi Kelvin. Attenzjoni għandha tingħata għall-medda limitata tat-temperatura li fiha ir-relazzjoni Arrehenius tkun valida fil-każ tat-trasformazzjoni li tkun irregolata bl-azzjoni mikrobjali.

2.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Għalkemm l-istudji huma mwettqa f'sistema artifiċjali tal-laboratorju, ir-riżultati jkunu jippermettu kalkolu tar-rata tat-traformazzjoni tas-sustanza tat-test u wkoll tar-rata tal-formazzjoni u tat-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni skond il-kondizzjonijiet fl-għalqa (36)(37).

Studju tal-passaġġ tat-trasformazzjonni tas-sustanza tat-test jipprovdi informazzjoni dwar il-mezz li bih is-sustanza aapplikata hija strutturament mibdula fil-ħamrija bir-razzjoni kimika u mikrobjali.

3. **RAPPORTAĠĠ**

RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi:

Is-sustanza tat-test:

— l-isem komuni, l-isem kimiku, in-numru CAS, il-formula strutturali (bl-indikazzjoni tal-posizzjoni tat-tikketti meta materjal radjo-tikkettjat ikun użat) u l-propjetajiet fiżiċi-kemikali relevanti (ara s-sezzjoni 1.5);

— il-purità (l-impuritajiet) tas-sustanza tat-test;

— il-purità tar-radjokimika tal-kimika tikkettjata u l-attività speċifika (meta xieraq);

Sustanzi ta' referenza:

— l-isem kimiku u l-istruttura tas-sustanzi ta' referenza kif użati għall- karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodott tat-trasformazzjoni;

Ħamrija tat-test:

— dettalji tas-sit tal-ġbir;

— id-data u l-proċedura tal-kampjunar tal-ħamrija;

▼B

— il-proprjetajiet tal-ħamrija, bħalma huma l-pH, il-kontenut karbonju organiku, it- *texture* (% ramel, % ħama, % tafal), *cation exchange capacity, bulk density*, il- karatteristika tar-ritenzjoni ta' l-ilma, u l-bijomass mikrobjali;

— it-tul tal-ħażna tal-ħamrija u l-kondizzjonijiet tal-ħażna (jekk maħżuna);

Kondizzjonijiet tat-test:

— id-dati tat-twettieq ta' l-istudji;

— l-ammont tas-sustanza tat-test applikata

— is-solventi użati u l-metodu ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;

— il-piż tal-ħamrija inizjalment ittrattata u kampjunata matul kull interval għall-analiżi;

— deskrizzjoni tas-sistema użata għall-inkubazzjoni;

— rati tan-nixxijiet ta' l-arja (għal sistemi biss ta' nixxija kontinwa);

— it-temperatura ta' l-apparat sperimentali;

— il-kontenut ta' l-umidità tal-ħamrija matul l-inkubazzjoni;

— il-biomassa mikrobjali inizjali, matul u fit-tmiem ta' l-istudji erobiċi;

— pH, il-konċentazzjoni ta' l-ossiġenu u l-potenzal inizjali redox, matul u fit-tmiem ta' l-istudji erobiċi u tal-mistgħadar;

— metodu/i tal-estrazzjoni;

— metodi għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni, fil-ħamrija u l-materjali ta' l- assorbazzjoni;

— in-numru ta' replikati u n-numru ta' kontrolli.

Riżultati:

— riżultat tad-determinazzjoni ta' l-attività mikrobjali;

— ir-repettabbilità u s-sensittività tal-metodi analitiċi wżati;

— ir-rati ta' l-irkupru (% valuri għal studju validu huma mogħtija fis-sezzjoni 1.7.1);

— ir-riżultati tat-tabelli espresssi fi % tad-doża inizjali applikata u bħala $mg.kg_{-1}$ ħamrija (fuq il-bażi ta' piż xott);

— il-bilanċ tal-massa, matul u qrib it-tmiem ta' l-istudji;

— il-karatterizzazzjoni ta' radjoattivita (marbuta) mhux strattibbli jew tar-residwi fil-ħamrija;

— kwantifikazzjoni tal-CO_2 rilaxxat u ta' komposti volatili oħrajn;

— grafika tal-konċentrazzjonijiet tal-ħamrija versus is-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni;

— in-nofs-ħajja jew DT_{50}, DT_{75} u DT_{90} tas-sustanza tat-test u, meta xieraq, dwar il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni li huma inklużi fil-limiti ta' l-affidibilità;

▼B

— kalkolu tar-rata tad-degradazzjoni abjotika permezz ta' kondizzjonijiet sterili;

— kalkolu tal-kinetiċi tat-trasformazzjoni għas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni;

— il-passaġġi proponuti tat-trasformazzjoni, meta xieraq;

— diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;

— dettalji ġenerali (i.e. kromatogrammi tal-kampjun, kampjun tar-rati tal-kalkoli tat-trasformazzjoni u l-mezzi użati għall-identifikazzjoni tal-prodotti tat-traformazzjoni).

4. **REFERENZI**

(1) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil -Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass -Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In "Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz -Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

ANNESS I

TENSJONI TA' L-ILMA, KAPAĊITÀ TA' L-GĦALQA (FC) U L-KAPAĊITÀ TAŻ-ŻAMMA TA' L-ILMA (WHC) [1]

L-għoli tal-kolonna ta' l- ilma [cm]	pF [a]	bar [b]	Rimarki
10^7	7	10^4	Ħamrija xotta
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Il-punt tal-mitbiela
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Il-medda tal kapaċità ta' l-għalqa [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (approsimazzjoni)
1	0	0,001	Ħamrija mistgħadra bl-ilma

[a] pF = log ta' cm kolonna ta' l-ilma.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Jikkorrispondi għal kontenut ta' ilma ta' bejn wieħed u ieħor 10 % f'ramel, 35 % f' *loam* u 45 % f'tafal.
[d] Il-kapaċità ta' l-għalqa mhix kostanti iżda tvarja bit-tip ta' ħamrija bejn pF 1,5 u 2,5.

It-tenzjoni ta' l-ilma hija mkejla fi cm tal-kolonna ta' l-ilma jew fi bar. Minħabba il-medda kbira tat-tenzjoni tal-ġbid, din hija espressa sempliċement bħala valur pF li huwa ekwivalenti għal-logaritmu ta' cm kolonna ta' l-ilma.

Il-kapaċità ta' l-għalqa hija definita bħala l-ammont ta' ilma li jista jkun maħżun kontra l-gravità minn ħamrija naturali, jumejn wara l-itwal perijodu ta' xita jew wara irrigazzjoni suffiċjenti hija determinata f'ħamrija mhux imqallba, in situ fil-għalqa. Il-kejl hu b'hekk mhux applikabbli għall-kampjuni tal-ħamrija imqallba fil-laboratorju. Il-valuri FC li jkunu determinati f'ħamrija mqallba jistgħu juru varjazzjonijiet sistematiċi kbar.

Il-kapaċità taż-żamma ta' l-ilma (Water holding capacity (WHC)) hija determinata fil-laboratorju b'ħamrija mqallba u mhux imqallba bis-saturazzjoni ta' kolonna ħamrija bl-ilma bit-trasport kapillari. Huwa partikolarment utili għal ħamrija mqallba u jista jkun sa 30 % akbar mill-kapaċità ta' l-għalqa (1) Huwa wkoll, b'mod sperimentali, aktar faċli li jkunu determinati b'mod affidabbli l-valuri FC.

Noti

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

ANNESS 2

KONTENUTI TA' L-UMIDITÀ FIL-ĦAMRIJA (g ilma kull 100 g ħamrija xotta) TAD-DIVERSI TIPI TA' ĦAMRIJA MINN PAJJIŻI VARJI

Umidità fil-ħamrija Kontenut fi Tip tal-ħamrija	skond il-pajjiż	Soil		
		WHC	pF = 1,8	pF = 2,5
Ramel	Ġermanja	28,7	8,8	3,9
Ramel Tafli	Ġermanja	50,4	17,9	12,1
Ramel Tafli	Żvizzera	44,0	35,3	9,2
Ħama' taflija	Żvizzera	72,8	56,6	28,4
Tafal biċ-ċappa	Brażil	69,7	38,4	27,3
Tafal biċ-ċappa	Ġappun	74,4	57,8	31,4
Tafal imrammel	Ġappun	82,4	59,2	36,0
Ħama' taflija	USA	47,2	33,2	18,8
Tafal imrammel	USA	40,4	25,2	13,3

▼B

ANNESS 3

Figura 1

Eżempju ta' apparat *flow-through* għall-istudju tat-trasformazzjoni tal-kemikali fil-ħamrija ([1]) ([2])

1: valvola tal-labra

2: flixkun tal-ħasil tal-gass li jkun fih l-ilma

3: ultra-membrana (kondizzjonijiet sterili biss), daqs tal-pori 0.2 µm

4: garafina tal-metaboliżmu tal-ħamrija (mifquha bl-ilma biss għall-kondizzjonijiet anerobiċi u mistgħadra)

5: nassa ta' l-etilin glikol għal komposti volatili ta' l-ossiġenu

6: nassa ta' l-aċidu sulfuriku għal komposti volatili alkalini

7, 8: nassa ta' l- idrossidu tas-sosju għal CO_2 & aċidi oħrajn volatili

9: arloġġ tan-nixxija.

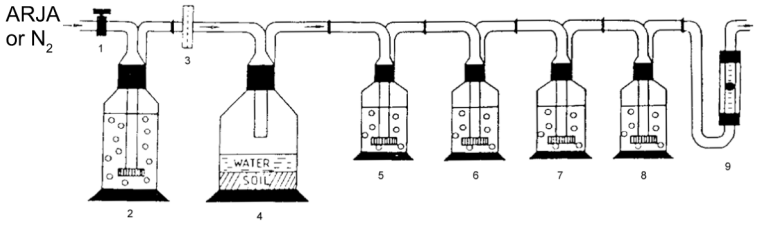
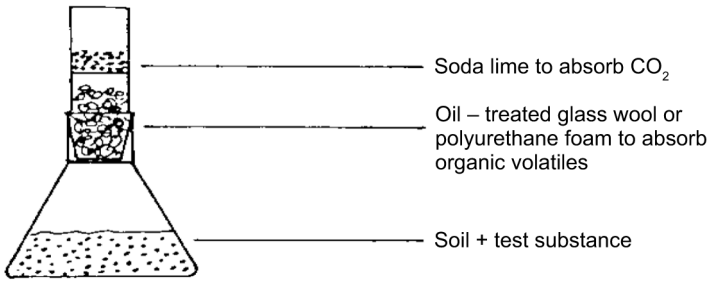


Figura 2

Eżempju ta' garaffina tat-tip *biometer* għall-istudju tat-trasformazzjoni tal-kemikali fil-ħamrija ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIS-SEDIMENT TAS-SISTEMI AKWATIĊI

1. METODU

Dan il-Metodu tat-Test huwa replika għal OECD TG 308 (2002)

1.1. INTRODUZZJONI

Il-kimiċi jistgħu jidħlu fl-ilmijiet tal-wiċċ, kemm baxxi u kemm fil-fond b'tali rotat bħala applikazzjoni diretta, skular tat-tbexxix, skular, soffija, drenaġġ, disposizzjoni ta' l-iskart, industria, effluwent domestiku jew agrikolu u d-deposizzjoni atmosferika. Dan il-Metodu ta' test jiddeskrivi l-metodu tal-laboratorju sabiex jassessja t-trasformazzjoni erobika u anerobika tal-kimiċi organiċi fis-sistema tas-sediment akwatiku. Dan il-Metodu tat-test huwa ibbażat fuq Linji ta' Gwida eżistenti (1) (2) (3) (4) (5) (6). Laqgħa ta' Ħidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Ħamrija/Sediment li nżammet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (7) qablet dwar in-numru u t-tip ta' ħamrija għall-użu f'dan it-test. Il-Laqgħa ta' Ħidma kienet ukoll għamlet rakkommandazzjonijiet li jirrigarjaw il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija, ibbażari fuq il-Linja ta' Gwida ISO (8). Tali studji huma meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati fil-ħamrija jew li huma pjuttost li jilħqu l-ambjent tal-ħamrija.

Il-kondizzjonijiet fis-sistemi tas-sedeiment akwatiku naturali ta' spiss huma erobiċi fil-faża ta' l-ilma tal-wiċċ. Is-saff tal-wiċċ tas-sediment jista jkun jew erobiku jew anerobiku, waqt li sediment aktar fond, normalment ikun anerobiku. Sabiex ikunu inklużi dawn il-possibbiltajiet kollha, iż-żewġ testijiet erobiċi u anerobiċi huma deskritti f'dan id-dokument. It-test erobiku jistimula kolonna erobika ta' l-ilma fuq saff ta' sediment erobiku li jkun fil-qiegħ b'xaqliba anerobika. It-test anerobiku jistimula sistema kompleta tas-sediment-ta'-l-ilma anerobiku. Jekk iċ-ċirkostanzi jindikaw li huwa meħtieġ li jkun hemm devjazzjoni sinifikanti minn dawn ir-rakommandazzjonijiet, per eżempju bl-użu tal-qalba tas-sediment jew tas-sedimenti li jistgħu kienu ġew esposti għas-sustanza tat-test, metodi oħrajn huma disponibbli għal dan l-iskop (9).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Standard International (SI) units (unitajiet tan-Norma Internazzjonali) għandhom ikunu wżati fi kwalunkwe każ.

Is-sustanza tat-test: Kwalunkwe sustanza, sew jekk kompost oriġinali jew il-prodotti relevanti tat-trasformazzjoni.

Prodotti tat-trasformazzjoni: Is-sustanzi kollha li jirriżultaw mir-reazzjonijiet tat-trasformazzjoni biotiċi jew abiotiċi tas-sustanza tat-test, inklużi iċ-CO2 u l-prodotti li huma marbuta mar-residwi.

Residwi marbuta: "Residwi marbuta" tirrapreżemnta komposti fil-ħamrija, pjanti jew annimali, li jippersistu fil-matriċi fil-għamla ta' sustanza oriġinali jew tal-prodotti metaboliti/trasformazzjoni wara l-estrazzjoni. Il-metodu ta' l-estrazzjoni m'għandux sostanzjalment jibdel il-komposti nfushom jew l-istruttura tal-matriċi. In-natura tar-rabta tista tkun kjarifikata parzjalment bil-metodi ta' l-estrazzjoni tat-tibdil-tal-matriċi u b'tekniċi analitiċi sofistikati. Sal-lum, per eżempju, ir-rabtiet kovalenti joniċi u sorptivi, kif ukoll l-ingassar, kienu ġew identifikati b'dan il-mod. Ġeneralment, il-formazzjoni tar-residwi marbuta tnaqqas il-bioaċċessibbiltà u l-biodisponabbiltà sinifikament (10) (Modifikati minn IUPAC 1984 (11)).

▼B

Trasformazzjoni erobika: (ossidazzjoni): Reazzjonijiet li jseħħu fil-preżenza ta' l-ossiġenu molekulari (12).

Trasformazzjoni anerobika: (tnaqqis): Reazzjonijiet li jseħħu fl-esklużjoni ta' l-ossiġenu molekulari (12).

Ilmijiet naturali: Huma l-ilmijiet tal-wiċċ akkwistati min għadajjar, xmajjar, nixxijat, eċċ.

Sediment: Hija taħlita ta' kostitwenti kimiċi minerali u organiċi, dawn ta' l-aħħar ikun fihom komposti ta' kontenut għoli tal-karbonju u n-nitroġenu u ta' piżijiet molekulari għoljin. Dan huwa depożitat b'ilma naturali u jifforma interfaži ma dak l-ilma.

Mineralizzazzjoni: Hija d-degradazzjoni kompleta ta' kompost organiku lejn CO_2, H_2O permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, u CH_4, CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet anerobiċi. Fil-kuntest ta' dan il-metodu tat-test, meta kompost bit-tikketta-14C ikun użat, il-mineralizzazzjoni tfisser dehradazzjoni estensiva li matula atomu tal-karbonu tikkettjat ikun ossidizzat bil-rilaxx ta' l-ammont xieraq ta' $^{14}CO_2$ jew $^{14}CH_4$

Half-life $t_{0,5}$, huwa l-ħin meħtieġ għal 50 % trasformazzjoni tas-sustanza tat-test meta t-trasformazzjoni tista tkun deskritta bil-kinetiċi ta' l-ewwel ordni; din hija independenti mill-konċentrazzjoni.

DT_{50} (Għibien Ħin 50): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 50 %.

DT_{75} (Għibien Ħin 75): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 75 %.

DT_{90} (Għibien Ħin 90): Huwa l-ħin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 90 %.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu wżati għall-karetterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti bil-metodi spektroskopiċi u kromatografiċi.

1.4. INFORMAZZJONI DWARIS-SUSTANZATAT-TEST

Sustanza tat-test mhux-ittikkettjata jew ittikkettjata tista tkun użata sabiex tkejjel ir-rata tat-trasformazzjoni, għalkemm materjal tikkettjat huwa preferut. Il-materjal tikkettjat huwa meħtieġ għall-istudju tal-passaġġ tat-trasformazzjoni u sabiex ikun stabbilit il-bilanċ tal-massa. Tikkettjar-14C huwa rakkomandat imma l-użu ta' iżotopi oħrajn bħal ma huma ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P, jistgħu wkoll ikunu utili. Sa kemm huwa possibbli, it-tikketta għandha tkun imqiegħda fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekolu ([1]) 6. Il-Purità tal-kimika u/jew tar-radjo-kimika tas-sustanza tat-test għandha tkun mill-anqas 95 %.

Qabel jitwettaq it-test, l-informazzjoni li ġejja, dwar is-sustanza tat-test, għandha tkun disponibbli:

(a) solubilità fl-ilma (il-Metodu A.6);

(b) solubilità f'solventi organiċi;

(ċ) pressjoni tal-fwar (il-Metodu A.4) u l-liġi kostanti Henry;

([1]) Per eżempju, jekk is-sustanza jkun fiha ċirku wieħed, l-ittikketjar fuq dan iċ-ċirku huwa meħtieġ. Jekk is-sustanza tat-test ikun fiha żewġ ċrieki jew iktar, studji separati jistgħu jkunu meħtieġa għall-evalwazzjoni tax-xorti ta' kull ċirku ittikkettjat u sabiex tinkiseb l-informazzjoni adattata fuq il-formazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni.

▼B

(d) il-koeffiċjent tal-qsim n–oktano/ilma (il-Metodu A.8);

(e) koeffiċjent ta' l-adsorbazzjoni (K_d, K_f jew K_{oc}, meta xieraq) (il-Metodu C.18);

(f) idrolisi 9il-Metodu C.7);

(g) kostant tad-disassoċjazzjoni (pKa) (Linja ta' Gwida OECD 112) (13);

(h) struttura kemikali tas-sustanza tat-test u l-posizzjoni tat-tikketta-(i)-iżotpika, jekk applikabbli.

Nota: It-temperatura li fiha dawn il-kejl kienu saru għandha tkun rappurtata.

Informazzjoni utili oħra tista tinkludi dettalji dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test fuq il-mikroorganiżmi, dettalji diġa disponibbli u/jew biodegradabbiltà inerenti, u dettalji dwar trasformazzjoni erobika u anerobika fil-ħamrija.

Il-metodi analitiċi (inklużi l-metodi ta' l-estrazzjoni u tat-tindif) għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tat-traformazzjoni tal-prodotti tagħha, għandhom ikunu disponibbli.

1.5. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-metodu deskritt f'dan it-test jutilizza sistema tas-sediment akwatiku erobiku u anerobiku (ara l-Anness 1) li tippermetti:

(i) il-kejl tar-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test f'sistema ta' sediment ta' l-ilma,

(ii) il-kejl tar-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test fis-sediment,

(iii) il-kejl tar-rata tal-mineralizzazzjoni tas-suistanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha (meta tikkettjata-C14, is-sustanza tat-test hija użata),

(iv) l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti tat-trasform-azzjoni fil- fażijiet ta' l-ilma u tas-sediment, inkluż il-bilanċ tal-massa (meta sustanza tat-test, tikkettjata, tkun użata),

(v) il-kejl tad-distrubuzzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha bejn iż-żewġ fażijiet matul perijodu ta' l-inkubazzjoni fid-dlam (sabiex ikun evitat, per eżempju, it-tnibbit ta' l-alga) f'temperatur kostanti. Il-valuri nofs-ħajja, DT_{50}, DT_{75} and DT_{90} huma determinati meta l-informazzjoni hekk teħtieġ, imma m'għandhiex tkun estrapolata wisq lura lejn perijodu sperimentali (ara s-sezzjoni 1.2).

Mill-anqas żewġ sedimenti u l-imijiet assoċċjati tagħhom huma meħtieġa għaż-żewġ studji erobiċi u anerobiċi rispettivament 97). B'dana kollu, jista jkun hemm każi meta aktar minn żewġ sedimenti għandhom ikunu wżati, per eżempju, dwar kimika li tista tkun preżenti f'ambjenti ta' l-ilma frisk u/jew marini.

▼B

1.6. L-APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

Il-metodu huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi kollha (mhux ittikkettjati jew radjotikkettjati) li dwarhom metodu analitiku b'eżattezza u sensittività suffiċjenti huma disponibbli. Dan huwa applikabbli għal komposti kemm xejn volatili, mhux volatili, li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. It-test m'għandux ikun applikat lejn kimiċi li huma ferm volatili minn ġewwa l-ħamrija (eż., fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistgħux jinżammu fil-ħamrija skond il-kondizzjonijiet sperimentali ta' dan it-test.

Dan il-metodu kien ġie applikat, s'issa, sabiex jistudja t-trasformazzjoni f'ilma frisk u sedimenti, imma l-prinċipju jista wkoll ikun applikat għal sistemi estwarini/marini. Dan mhux adattat biex jistimu kondizzjonijiet f'ilma mexxej (eż. xmajjar) jew fil-baħar miftuħ.

1.7. KRITERJA TAL-KWALITÀ

1.7.1. **Irkupru**

L-estrazzjoni u l-analiżi ta', mill-anqas, nofs il-kampjunu duplikati ta' l-ima u tal-ħamrija, wara ż-żieda tas-sustanza tat-test, tagħti l-ewwel indikazzjoni tar-repetabbiltà tal-metodu analitiku u ta' l-uniformità tal-proċedura ta' l-applikazzjoni għas-sustanza tat-test. L-irkupri fi stadji aktar tard ta' l-esperimenti huma mogħtija bil-bilanċi rispettivi tal-massa (meta materjal tikkettjat ikunu wżat). L-irkupri għandhom ikunu fil-medda ta' minn 90 % sa 110 % tal-kimiċi ittikkettjati (6) u minn 70 % sa 110 % għal kimiċi mhux ittikkettjati.

1.7.2. **Ir-repettabbiltà u s-sensittività tal-metodu analitiku**

Ir-repetabbilità tal-metodu analitiku (eskluża l-peffiċjenza ta' l-estrazzjoni inizjali) sabiex tkun kwantifikata s-sustanza tat-test u tat-trasformazzjoni tal-prodotti tista tkun verifikata b'analiżi dupplikata ta' l-istess estratt tal-ħamrija, inkubat għal tul ta' żmien biż-żejjed għall-formazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti.

Il-limitu ta' sejbien (limit of detection (LOD)) tal-metodu analitiku għas-sustanza tat-test u għat-trasformazzjoni tal-prodotti għandu jkun mill-anqas 0,01 $mg.kg^{-1}$ ħamrija (bħala sustanza tat-test) jew 1 % tad-doża applikata, liema minnhom hija l-anqas. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni (limit of quantification (LOQ)) għandu wkoll ikun speċifikat.

1.7.3. **L-eżatezza tad-dettalji tat-trasformazzjoni**

Analiżi regressiva tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-ħin, tagħti informazzjoni xierqa dwar l-affiddabbilità tal-kurva tat-trasformazzjoni u tippermetti il-kolkolu tal-limiti affidabbli ta' nofs-ħajjiet (fil-każ ta' psewdo kinetiċi ta' l-ewwel ordni) jew il-valuri DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90}

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.8.1. **Sistema u apparat tat-test**

L-istudju għandu jkun jkun imwettaq fl-kontenuturi tal-ħġieġ (eż. flixkien, tubi taċ-ċentrifuga), sakemm informazzjoni preliminari (bħal ma huwa l-koeffiċjent tal-qasmi n-oktanol-ilma, id-dettaltji tas-sopzjoni, eċċ.) tkun tindika li s-sustanza tat-test tista tkun teħel mal-ħġieġ, f'liema każ, materjal alternattiv (bħala ma hu t-teflon) għandu mnejn ikun ikkonsidrat. Meta s-sustanza tat-test hija magħrufa li teħel mal-ħġieġ, jista jkun possibbli li titnaqqas din il-problema bl-użu ta' wieħed jew aktar minn dawn il-metodi li ġejjin:

▼B

— iddetermina l-massa tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni kif sorbiti mal-ħġieġ;

— assigura ħasla bis-solvent ta' l-oġġetti kollha tal-ħġieġ fit-tmiem tat-test;

— l-użu ta' prodotti formulati (ara wkoll is-sezzjoni 1.9.2);

— uża ammont miżjud tal-ko-solvent bħala żieda tas-sustanza tat-test mas-sistema; jekk ko-solvent ikun użat, dan għandu jkun ko-solvent li ma jkunx idewweb is-sustanza tat-test.

Eżempji ta' apparat xieraq, i.e. sistemi tal-ħġieġ b'nixxija kontinwa u tat-tip biometriku, huma murija fl-Annessi 2 u 3, rispettivament (14). Sistemi utili oħrajn ta' l-inkubazzjoni huma deskritti fir-referenza 15. Id-disinn ta' l-apparat sperimentali għandu jippermetti l-iskambju ta' l-arja jew tan-nitroġenu u tal-prodotti volatili li jkunu ġew maqbuda. Il-qisien ta' l-apparat għandu jkun tali li l-ħtiġiet tat-test ikun hemm konformità magħhom (ara s-sezzjoni 1.9.1). Il-ventilazzjoni tista tkun ipprovduta jew bi bżieżaq ġentili jew bill-passaġġ ta' l-arja jew tan-nitroġenu minn fuq wiċċ l-ilma. F'dan il-każ ta' l-aħħar, taħwid ġentili ta' l-ilma minn fuq jista jkun rakkommadabbli għal distribuzzjoni aħjar ta' l-ossiġenu jew tan- nitroġenu fl-ilma. Arja ħielsa minn CO_2 m'għandhiex tkun użata minħabba li dan jirriżulta f'żidiet fil-pH ta' l-ilma. Fi kwalunkwe każ, it-tqallib tas-sediment mhux mixtieq u għandu jkun evitat, sa kemm ikun possibbli. Kimiċi kemm xejn volatili għandhom ikunu ittestjati f'sistema tip-ta'-barometru b'taħwid ġentili tal-wiċċ ta' l-ilma. Kontenituri magħluqa, bi spazju fil-wiċċ ta', jew l-arja atmosferika jew tan-nitroġenu, u fjali interni għal-qbil ta' prodotti volatili, jistgħu wkoll ikunu wżati (16). Skambju regolari tal-gass fl-ispazju huwa meħtieġ fit-test erobiku sabiex jikkumpensa għall-konsum ta' l-ossiġenu mill-biomassa.

Nasses xierqa għall-ġbir tal-prodotti volatili tat-trasformazzjoni jinkludu, imma mhux ristertti għal, 1 $mol.dm^{-3}$ taħlitiet ta' l-idrossidu tal-putassa jew ta' l-idrossidu tas-sodju, għad-diossidu tal-karbonju ([1]) 7u tal-glikol etiliniku, l-etanolamin jew 2 % paraffin fi xilene għal komposti organiċi. Volatili ffurmati permezz ta' kondizzjonijiet anerobiċi, bħal ma huwa l-metanju, jistgħu ikunu miġbura, per eżempju, b'għarbiel molekulari. Tali volatili jistgħu ikunu maħruqa, per eżempju, iċ-CO_2 li jgħaddi mill-gass matul tubu tal-kwart mimli bi CuO f'temperatura ta' 900 ^{o}C u li jiġbor iċ- CO_2 iffurmat f'assorbatur bl-alkali (17).

Strumentazzjoni tal-laboratorju għal analiżi kimika tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni hija meħtieġa (i.e. kromatografija likwida tal-gass (GLC), kromatografija likwida ta' mġieba qawwija (HPLC), kromatografija tas-saff irqieq (TLC), spektroskopju tal-massa (MS), spektroskopju tal-kromatografija-tal-massa tal-gass (GC-MS), spektrometru tal-kromatografija tal-massa likwida (LC-MS), reżonanza manjetika nukleari (NMR), eyc.) inklużi s-sistemi tas-sejbien għal kimiċi radjotikkettjati jew mhux tikkettjati, kif xieraq. Meta materjal radjo-tikkettjat ikun użat bħala għadd tax-xintillazzjoni tal-likwidu u ossidizzatur tal-kombustjoni (għall-kombustjoni ta' kampjuni tas-sediment qabel l-analiżi tar-radjo-attività) ikun ukoll meħtieġ.

Apparat normali ieħor tal-laboratorju, għal determinazzjonijiet fiżiko-kimiċi u bioloġiċi (ara s-sezzjoni Tabella 1, is-sezzjoni 1.8.2.2(l-oġġetti tal-ħġieġ, il-kimiċi u r-reaġenti huma meħtieġa, kif xieraq.

([1]) Bħalma dawn is-soluzzjonijiet ta' abżorpzjoni alkalini jassorbu wkoll id-dijossidju tal-karbonju mill-arja ta' ventilazzjoni u li iffurmati peremzz ta' respirazzjonni f'esperimenti ajrobiċi, għandhom jiġu mibdula f'intervali regolari sabiex tiħi evitata is-saturazzjoni tagħhom u b'hekk it-telf tal-kapaċita' ta' l-abżorpzjoni tagħhom

▼B

1.8.2. **L-għażla u n-numru ta' sedimenti akwatiċi**

Is-siti tal-kampjunar għandhom ikunu magħżula skond l-iskop tat-test, f'xi sitwazzjoni partikolari. Fl-għażla tas-siti tal-kampjunar, l-istorja fl-isfond, agrikola, indistriali jew domestika dwar il-wesgħa tal-ġbir u ta' l-ilmijiet fin-naħa ta' fuq, għandhom ikunu ikkunsidrati. Is-sedimenti m'għandhomx ikunu wżati jekk ikunu ġew kontaminati bis-sustanza tat-test jew bl-istrutturi analogi tagħha matul l-4 snin preċedenti.

1.8.2.1. *L-għażla tas-sediment*

Żewġ sedimenti huma normalment użati għall-istudju erobiċi (7). Iż-żewġ sedimenti magħżula għandhom ikunu differenti fir-rigward tal-kontenut tal-karbonju organiku u fil-formazzjoni tagħhom. Sediment wieħed għandu jkollu kontenut għoli ta' karbonju organiku (2,5-7,5 %) u ta' formazzjoni fina, is-sediment l-ieħor għandu jkollu kontut baxx tal-karbonju organiku (0,5-2,5 %) u formazzjoni rozza. Id-differenza bejn il-kontenuti tal-karbonu organiku għandha, normalment, tkun ta' mill-anqas 2 %. "Formnazzjoni fina" hija definita bħala (tafal + ħama') [10] ([1]) 8kontenut ta > 50 % u "formazzjoni rozza" hija definita bħala (tafal + ħama') kontenut ta' < 50 %. Id-differenza fil-kontenut (tafal + ħama') għaż-żewġ sedimenti għandha normalment tkun mill-anqas 20 %. Fil-każi, meta l-kimika tista wkoll tilħaq l-ilmijiet marittimi, mill-anqas waħda mis-sistemi tas-sediment ta' l-ilma għandha tkun ta' oriġini marittima.

Għal studju strettament anerobiku, żewġ sedimenti (inklużi l-imijiet assoċjati tagħhom) għandhom ikunu miġbura minn żoni anerobiċi tal-partijiet ta' l-ilma tal-wiċċ (7). Iż-żewġ fażijiet tas-sediment u ta' l-ilma għandhom ikunu mqanda u ittrasportati bir-reqqa bl-esklużjoni ta' l-ossiġenu.

Parametri oħrajn jistgħu ikunu importanti fil-għażla tas-sedimenti u għandhom ikunu ikkunsidrati fuq il-bażi ta' każ b'każ. Per eżempju, il-medda pH tas-sedimenti tkun importanti għall-kimiċi tat-testijiet li dwarhom trasformazzjoni u/jew sorpzjoni jistgħu ikunu pH-dipendenti. Id-dipendenza-pH tas-sorpzjoni tista tkun riflessa bil-pKa tas-sustanza tat-test.

1.8.2.2. *Karatterizzazzjoni tal-kampjuni tas-sedimenti ta' l-ilma*

Parametri ewlenija li għandhom ikunu mkejla u inklużi fir-rapport (b'referenza għall-metodu wżat) kemm għall-ilma u għas-sediment, u l-istadju tat-test li fih dawk il-parametri għandhom ikunu determinati, huma miġbura f'sommarju fit-Tabella ta' hawn taħt. Għall-informazzjoni, il-metodi tas-sejbin għad-determinazzjoni ta' dawn il-parametri huma mogħtija fir-referenzi (18) (19) (20) (21).

B'żieda, parametri oħrajn jistħu li jkunu metieġa li jkunu mkejla u nklużi fir-rapport fuq il-bażi ta' każ b'każ (eż. għall-ila frisk: Partiċelli, alkalinità, toqol. Kondittività, NO_3/PO_4 (relattività u valuri individwali); għas-sedimenti: Il-kapaċità ta' l-iskambju taljonji, il-kapaċità taż-żamma ta' l-ilma, Il-karbonat, in-nitroġenu u l-fosfru totali; u għas-sistemi marittimi: Salinità). L-analiżi tas-sedimenti u l-ilma għan-nitrat, is-sulfat u l-ħadid bio-disponibbli, u l-ossibbiltà ta' aċċettaturu elettroni oħrajn tista tkun utili fl-assaġġ tal-kondizzjonijiet redox, speċjalment b'relazzjoni mat-trasformazzjoni anerobika.

([1]) Tafal u ħama) hija il-frazzjoni minerali tas-sediment bid-daqs tal-partiċella ta' < 50 μm.

▼B

Parametri tal-kejl għall-karatterizzazzjoni tal-kampjunu fis-sediment ta' l-ilma (7)(22)(23)

Parametru	Stadju tal-proċedura tat-test					
	Kampjun ta' l-għalqa	Wara t-tqandil	Bidu ta' l-akklamit - azzjoni	Bidu tat-test	Matul it-test	Tmiem tat-test
Ilma						
Oriġini/sorsi	x					
temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
O_2 konċentrazzjoni (*)	x		x	x	x	x
Potenzal Redox (*)			x	x	x	x
Sediment						
Oriġini/sorsi	x					
Il-fond tas-saff	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuzzjon i tad-daqs tal-partiċelli		x				
TOC		x	x	x		x
Biomassa mikrobjali (*)		x		x		x
Potenzal Redox (**)	Osservazzjonijiet (lewn/riħa)		x	x	x	x

(*) Riżultati tar-riċerka riċenti wrew li il-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal- *water oxygen* l-ossiġnu ta' l-ilma u tal-potenzjalitajiet *redox* m'għandhomx valur la mekkanistiku u lanqas ta' tbassir fejn għandu x'jaqsam it-tkabbir u l-iżvilupp tal-popolazzjoni mikrobjali fl-ilmijiet tal-wiċċ. (24) (25).

(**) Id-determinazzjoni tad-domanda bijokemikali ta' l-ossiġnu (BOD, fit-teħid tal-kampjuni ta' l-għelieqi, fil-bidu u fi tmiem it-test) jistgħu jkunu għodod aħjar għall-interpretazzjoni u l-evalwazzjoni tal-bijotrasformazzjoni ajrobika tar-rati u r-rotot ajrobiċi (26), il-metodu ta' fumigazzjoni (27) jew *plate count measurements* (eż. il-batterja, l-*actinomycetes, fungi* u l-kolonji totali) għal studji ajrobiċi; ir-rata tal-*methanogenesis* għal studji anajrobiċi.

1.8.3. **Ġbir, Tqandil u Ħażna**

1.8.3.1. *Il-ġbir*

L-abbozz tal-gwida ISO dwar il-kampjunar tas-sediment tal-qiegħ 98 għandu jkun użat għall-kampjunar tas-sediment. Kampjuni tas-sediment għandhom ikunu miġbura mis-saff intier ta' fuq, 5 sa 10 cm, tas-sediment. L-ilma assoċjat għandu jkun miġbur mill-istess sit jew lokalità u fl-istess waqt bħas-sediment. Għal studju anerobiku, il-ġbir tal-kampjuni tas-sediment u ta' l-ilma assoċjat u t-trasportazzjoni tagħhom għandu jkun bl-esklużjomni ta' l-ossiġenu (28) (ara s-sezzjoni 1.8.2.1). Uħud mill-apparati tal-kampjunar huma deskritti fil-litteratura (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Tqandil*

Is-sediment huwa separat mill-ilma permezz tal-filtrazzjoni u s-sediment ikun magħrbel fl-undità minn għarbiel ta' 2 mm bl-użu ta' l-ilma eċċessiv tal-lokalita, li imbagħad ikunu mormi. Imbagħad, ammonti magħrufa ta' sedimenti u ilma huma mħallta fir-relattività mixtieqa (ara s-sezzjoni 1.9.1) f'garafini ta' l-inkubazzjoni u ippreparati għall-perijodu ta' l-akklamizzazzjoni (ara s-sezzjoni 1.8.4). Għal studju anerobiku, il-passi kollha tat-tqandil għandhom iseħħu bl-esklużjoni ta' l-ossiġenu (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Ħażna*

L-użu ta' kampjun frisk tas-sediment u l-ilma huwa ferm rakkommandabbli, imma jekk ħażna tkun meħtieġa, Is-sediment u l-ilma għandhom ikunu magħrbla kif deskritt hawn fuq u maħżuna flimkien, mifqugħa bl-ilma (6-10 cm saff ta' ilma), fid-dlam, fi 4 ± 2 $^{o}C_{4}$ għal massimu ta' [13] ġimghat (7)(8)(23). Il-kampjuni li huma ntiżi għal studji erobiċi għandhom ikunu maħżuna b'aċċess liberu ta' arja 9eż. f'kontenituri miftħa), waqt li dawk għal studji erobiċi bl-esklużjoni ta' l-ossiġenu. L-iffriżar tas-sediment u l-ilma u waqt l-inxif tas-sediment m'għandux iseħħ matul it-trasportazzjoni u l-ħażna.

1.8.4. **Preparazzjoni tal-kampjuni sediment/ilma għat-test**

Perijodu ta' akklamitazzjoni għandu jseħħ qabel iż-żieda tas-sustanza tat-test, b'kull kampjun ta' sediment/ilma jkun miqiegħed fir-reċipjent ta' l-unkubazzjoni li għandu jkun użat għat-test ewlieni, u l-akklamizzazzjoni tkun imwettqa skond l-istess kondizzjonijiet bħal fit-test ta' l-inkubazzjoni (ara s-sezzjoni 1.9.1). Il-perijodu ta' l-akklimizzazzjoni huwa ż-żmien meħtieġ għal stabbilità raġjonevoli tas-sistema kif rifless bil-pH, il-konċentrazzjoni ta' l-ossiġenu fl-ilma, il-potenzal tar-redox tas-sediment u l-ilma, u l-fażijiet tas-separazzjoni makroskopika. Il-perijodu ta' l-akklamizzazzjoni għandu normalment idem bejn ġimgħa waħda u ġimgħatejn u m'għandux jeċċedi erba' ġimghat. Ir-riżultati tad-determinazzjonijiet imwettqa matul dan il-perijodu għandhom ikunu nlkużi fir-rapport.

1.9. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.9.1. **Kondizzjonijiet tat-test**

It-test għandu jkun imwettaq fl-apparat ta' l-inkubazzjoni (ara s-sezzjoni ċ.8.1) b'relattività tal-volum ta' l-ilma mas-sedimet ta' bejn 3:1 u 4:1, u saff tas-sediment ta' 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]) 9. Ammont minimu ta' 50 g ta' sediment (bażi ta' piż xott) kull reċipjent ta' l-inkubazzjoni huwa rakkommandat.

It-test għandu jkun imwettaq fid-dlam, b'temperatura kostanti fil-medda ta' 1- sa 30 ^{o}C. Temperatura ta' (20 ± 2) ^{o}C hija xierqa. Meta xieraq, temperatura addizzjonali aktar baxxa (eż. 10 ^{o}C) tista tkun meqjusha fuq il-bażi ta' każ b'każ, jiddependi mill-informazzjoni meħtieġa mit-test. It-temperatura ta' l-inkubazzjoni għandha tkun sorveljata u nkluża fir-rapport.

([1]) Studji riċenti wrew li il-ħżin f'temepratura ta' 4 ^{o}C jista' jwassal għal tnaqqis tal-kontenut tal-karbonju organiku tas- sediment li jista' jirriżulta fi tnaqqis ta' l-attivita' mikorbjali (34).

▼B

1.9.2. **It-trattament u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test**

Konċentrazzjoni waħda tal-kimika tat-test hija użata ([1]) . Għall-kimiċi tal-protezzjoni ta' l-uċuġ applikati direttament lejn is-saffi ta' l-ilma, id-doża massima tat-tikketta għandha tkun meqjusa bħala ir-rata massima ta' l-applikazzjoni ikkalkolata fuq il-bażi taż-żona tal-wiċċ ta' l-ilma fir-reċipjent tat-test. Fil-każi l-oħrajn kollha, il-konċ-emtrazzjoni li trid tkun użata għandha tkun ibbażata fuq previżjonijiet mill-emissjonijiet ambjentali. Attenzjoni għandha tingħata sabiex tkun assigurata li konċentrazzjoni adekwata tas-sustanza tat-test tkun applikata sabiex tikkaratterizza r-rotta tat-tras-formazzjoni u tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasform-azzjoni. Jista jkun meħtieġ li jkunu applikati dożi aktar għoljin (eż. 19-il darba) f'sitwazzjonijiet meta l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test ikunu qrib il-limitu tas-sejbien fil-bidu ta' l-istudji u/jew meta prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri ma jkunux faċli li jkunu misjuba meta preżenti fi 10 % tar-rata ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. B'dana kollu, jekk konċentrazzjonijiet għola tat-test huma wżati, dawn m'għandhox ikollhom effett ħażin sinifikanti fuq l-attività mikrobjali tas-sistema ilma-sediment. Sabiex tkun akkwistat konċentrazzjoni kostanti tas-susstanza tat-test fir-reċipjenti ta' qisien differenti, aġġustament tal-kwantità tal-materjal applikat jista jkun meqjus bħala xieraq, ibbażat fuq il-fond tal-kolonna ta' l-ilma fir-reċipjent b'relazzjoni mal-fond ta' l-ilma fl- għalqa (li huwa preżunt li huwa 100 cm, imma fond ieġor jista jkun użat). Ara l-Anness 4 għal eżempju tal-kalkolazzjoni.

Idealment, is-sustanza tat-test għandha tkun applikata bħala taħlita akweja ġewwa l-faži ta' l-ilma tas-sistema tat-test. Jekk ma jkunx jista jsir mod ieħor, l-użu ta' ammonti anqas ta' solventi li jitħaltu ma l-ilma (bħal ma huma l-aċetun, l-etanol) huwa permisibbli għall-applikazzjoni u d-distribuzzjoni tas-sustanza tat-test, imma dan m'għandux jeċċedi 1 % v/v u m'għandux ikollu effeti ħżiena fuq l-attività mikrobjali tas-sistema tat-test. Attenzjoni għandha tingħata fil-ġenerazzjoni tat-taħlita akweja tas-sustanza tat-test – l-użu ta' kolonni ġenerati u t-taħlit minn qabel jista jkun xieraq sabiex tkun assigurata omoġenità kompluta. B'segwiment taż-żieda tat-taħlita akweja mas-sistema tat-test, taħvid ġentili tal-faži ta' l-ilma huwa rakkommandat, li jqanqal is-sediment mill-anqas possibbli.

L-użu ta' prodotti formulati mhux normalment rakkommandat minħabba li l-ingredjenti tal-formulazzjoni jistgħu jaffettwaw is-sustanza tat-test u/jew tal-prodotti tat-trasformazzjoni bejn il-faživiet ta' l-ilma u tas-sediment. B'dana kollu, eż. għal sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu, l-użu ta' materjal formulat jista jkun alternattiva xierqa.

In-numru ta' reċipjenti ta' l-inkubazzjoni jiddependi min-numru ta' drabi tal-kampjunar (ara s-sezzjoni 1.9.3). Numru suffiċjenti tas-sistemi tat-test għandhom ikunu nklużi sabiex żewġ sistemi jistgħu ikunu sagrifikati f'kull waqt tal-kampjunar. Meta l-unitajiet tal-kontroll ta' kull sistema tas-sediment akwatiku jkunu wżati, dawn m'għandhomx ikunu ittrattati bis-sustanza tat-test. L-unitajiet tal-kontroll jistgħu ikunu wżati għad-determinazzjoni tal-biomassa mikrobjali tas-sediment u tal-karbonju organiku totali ta' l-ilma u tas-sediment fit-tmiem ta' l-istudju. Iż-żewġ unitajiet tal-komntroll (i.e. unità tal-kontroll waħda ta' kull sediment akwatiku) jistgħu ikunu wżati sabiex jissorveljaw il-parametri meħtieġa fis-sediment u fl-ilma matul il-perjodu ta' l-akklamitizzazzjoni (ara t-Tabella fis-sezzjoni 1.8.2.2). Żewġ unitajiet addizzjonali tal-kontroll għandhom ikunu nklużi fil-każ li sustanza tat-test tkun applikata permezz ta' solvent li jkejjel l-effetti ħżiena fuq l-attività mikrobjali tas-sistema tat-test.

([1]) Test bit-tieni konċentrazzjoni jista' jkun utili għall- kemikali li jilħqu l-ilmijiet tal-wiċċ permezz ta' *entry routes* differenti u dan jwassal għal konċentrazzjonijiet differenti b'mod sinifikattiv, sakemm l-iktar konċentrazzjoni baxxa tista' tkun analizzata b'kemm jista' jkun eżattezza.

▼B

1.9.3. **It-tul taż-żmien u l-kampjunar tat-test**

It-tul ta' l-esperiment m'għandux normalment jeċċedi 100 jum (6), u għandu jkompli sa kemm il-passaġġ tal-gradazzjoni u l-għamla tad-distrubuzzjoni ta' l-ilma/sediment tkun stabbilita jew meta 90 % tas-sustanza tat-test tkun dissipata fit-trasformazzjoni u/jew il-volatilizzazzjoni. In-numru ta' waqtiet tal-kampjunar għandhom ikunu mill-anqas sitta (inkluż il-ħin żero), bi studju preliminarji voluntarju (ara s-sezzjoni 1.9.4) ikunu wżat sabiex tkun stabbilit r-regola xierqa tal-kampjunar u tat-tul tat-test, sakemm informazzjoni suffiċjenti ma tkunx diġa disponibbli dwar is-sustanza tat-test minn studju preċendenti. Għal sustanzi tat-test idrofobiċim punti addizzjonali tal-kampjunar matul il-perijodu inizjali ta' l-istudju jistgħu ikunu meħtieġa sabiex tkun determinata r-rata tad-distribuzzjoni bejn il-fażijiet ta' l-ilma u tas-sediment.

Filwaqtiet xierqa tal-kampjunar, ir-reċipjenti kollha ta' l-inkubazzjoni (dupplikat) huma mneħħija għall-analiżi. Is-sediment u l-ilma tal-wiċċ huma analizzati separatament ([1]) 1. L-ilma tal-wiċċ għandu jkun imneħħi bil-galbu b'ċaqlieq mill-anqas tas-sediment. L-estrazzjoni u l-karatterizzazzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni għandhom isegwu l-proċeduri analitiċi xierqa. Attenzjoni għandha tingħata għat-tneħħija tal-materjal li jkun jkun ġie assorbit mar-reċipjent ta' l-inkubazzjoni jew mat-tibi ta' l-interkonnessjoni wżati li jaqbdu l-volatili.

1.9.4. **Test preliminarju voluntarju**

Jekk ir-regolazzjoni tat-tul u tal-kampjunar ma jistgħux ikunu ikkalkolati minn studju relevanti oħrajn dwar is-sustanza tat-test, studju preliminari voluntarju jista jkun meqjus bħala xieraq, li għandu jkun imwettaq bl-użu ta' l-istess kondizzijonijiet tat-test proponuti għall-istudju definittiv. Kondizzjonijiet sperimentali relevanti u r-riżultati mit-test preliminarju, jekk imwettaq, għandhom ikunu rraportati fil-qosor.

1.9.5. **Kejl u analiżi**

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u l-prodotti tat-trasformazzjoni f'kull waqt tal-kampjunar fl-ilma u fis-sediment għandhom ikunu mkejla u rraportati (bħala konċentrazzjoni u bħala persentaġġ ta' l-applikat). Ġeneralment, il-prodotti tat-trasformazzjoni misjuba fl-≥10 % tar-radjoattività applikata fis-sistema totali ta' ilma-sediment fi kwalunkwe waqt tal-kampjunar għandhom ikunu identifikati, sakemm ma jkunx raġjonevolment ġustifikat mod ieħor. Il-prodotti tat-trasformazzjoni li dwarhom il-konċentrazzjonjiet huma kontinwament miżjuda matul l-istudju għandhom ukoll ikunu ikkonsidrati għall-identifikazzjoni, anki jekk il-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jkunux jeċċedu l-limitu mogħti hawn fuq, minħabba li dan jista jindika persistenza. Dan ta' l-aħħar għandu jkun ikkonsidrat fuq il-bażi ta' każ b'każ, bil-ġustifikazzjoni tkun ipprovduta fir-rapport.

Ir-riżultati mis-sistemi tal-qbid tal-gassijiet/volatili (CO_2 u oħrajn, i.e. komposti organiċi volatili) għandhom ikunu rrapurtati f'kull waqt tal-kampjunat. Ir-rati tal-mineralizzazzjoni għandhom ikunu rrapurtati. Residwi mhux estrattibbli (marbuta) fis-sediment għandhom ikunu irrapurtati f'kull punt tal-kampjunar.

([1]) F'każijiet fein ir-*re-oxidation* mgħaġġla tal-prodotti tat-trasformazzjoni anajrobika tista' sseħħ, il-kondizzjonijiet anajrobiċi għandhom jinżammu waqt l-ikkampjunar u l-analiżi.

▼B

2. **DATA**

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Il-bilanċ jew l-irkupru tal-massa totali (ara s-sezzjoni 1.7.1) tar-radjoattività miżjuda għandhom ikunu ikkalkolati f'kull waqt tal-kampjunar. Ir-riżultati għandhom ikunu irrapurtati bħala persentaġġ tar-radjoattività miżjuda. Id-distribuzzjoni tar-radjoattività bejn l-ilma u s-sediment għanda tkun irrapurtata bħala konċentrazzjonijiet u persentaġġi, f'kull waqt tal-kampjunar.

In-nofs-ħajja, il-DT_{50} u, jekk xieraq, il-DT_{75} u il-DT_{90} tas-sustanza tat-test għandhom ikunu ikkalkolati flimkien mal-limiti ta' affidabbilità tagħhom (ara s-sezzjoni 1.7.3). L-informazzjoni dwar ir-rata tad-dissipazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma u fis-sediment tista tkun akkwistata mill-użu ta' l-għodda xierqa ta' l-evalwazzjoni. Dawn jistgħu ivarjaw mill-applikazzjoni tal-kinetiċi ta' psewdo-l-ewwel-ordni, tat-teknika li timxi mal-kurva emprika li tapplika għal soluzzjonijiet grafiċi jew numeriċi u l-assaġġ aktar kumpless bl-użu, per eżempju, tal-mudelli ta' kompartiment singolu jew multiplu. N Aktar dettalji jistgħu ikunu akkwistati mill-letteratura relevanti kif ippubblikata (35) (36) (37).

Ir-resqien kollu għandu s-saħħa u d-debbolizzi tiegħu u jvarja konsiderevolment fil-komplessità, Preżunzjoni tal-kinetiċi ta' l-ewwel ordni tista ssir b'simplifikazzjoni żejda tal-proċessi tad-degradazzjoni u tad-distribuzzjoni, imma meta possibbli li tagħti terminu (ir-rata kostanti jew nofs-ħajja) li faċilment ikunu jifthiemu u l-valur fil-mudellar tas-simulazzjoni u l-kalkolu tal-konċentrazzjonijiet ambjentali previsti. Resqien empiriku jew trasformazzjonijiet lineari jistgħu jirriżultaw fi dħul aħjar tal-kurvi mad-dettall u għalhekk jippermettu estimi aħjar tan-nofs-ħajja, DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90}. L-użu tal-kostanti derivati, b'dana kollu huwa limitat. Mudelli kumpartimentali jistgħu jiġġeneraw numru ta' kostanti utili ta' valur fir-riskju ta' l-assaġġ li jiddeskrivi r-rata tad-degradazzjoni f'kumpartimenti differenti u d-distribuzzjoni tal-kimika. Dawn għandhom ukoll ikunu wżati għall-estimi tal-kostanti tar-rata għall-formazzjoni u d-degradazzjoni ta' prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni. Fil-każi kollha, il-metodu wżat għandu jkun ġustifikat u min jagħmel l-esperiment għandu juri b'mod grafiku u/jew l-istatistika ta' dħul aħjar.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test:

— l-isem komuni, l-isem kimiku, in-numru CAS, il-formula strutturali (bl-indikazzjoni tal-posizzjoni tat-tikketti meta materjal radjo-tikkettjat ikun użat) u l-propjetajiet fiżiċi-kemikali relevanti;

— il-purità (l-impuritajiet) tas-sustanza tat-test;

— il-purità tar-radjokimika tal-kimika tikkettjata u l-attività speċifika (meta xieraq);

▼B

Sustanzi ta' referenza:

— l-isem kimiku u l-istruttura tas-sustanzi ta' referenza kif użati għall- karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodott tat-trasformazzjoni;

Sedimenti u ilmijiet tat-test:

— il-lokalità u d-deskrizzjoni tas-sit(i) tal-kampjunar tas-sediment akwatiku, inkluża, jekk possibbli, l-istorja tal-kontaminazzjoni;

— l-informazzjoni kollha li tirrigwardja il-ġbir, il-ħażna (jekk ikun hemm) u l-akklamizzazzjoni tas-sistemi ta' l-ilma/sediment;

— karatteristiċi tal-kampjunar ilma-sediment kif elenkati fit-Tabella fis-sezzjoni 1.8.2.2.

Kondizzjonijiet tat-test:

— is-sistema tat-test użata (eż. in-nixxija kontinwa, il-biometrika, il-mezz tal- ventilazzjoni, il-metodu tat-taħwid, il-volum ta' l-ilma, il-massa tas-sediment, il-ħxuna kemm tas-saff ta' l-ilma u tas-sediment, il-qisiem tar-reċipjenti tat-test, eċċ.);

— l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test għas-sistema tat-test: Il-konċentrazzjoni tat-test kif użata, in-numri ta' repliki u l-modula tal-kontrolli ta' l-applikazzjoni tas-sustanzaa tat-test (eż. l-użu tas-solvent jekk ikun hemm), eċċ.;

— temperatura ta' l-inkubazzjoni;

— id-drabi tal-kampjuna;

— il-metodi ta' l-estrazzjoni u l-effiċċjenzi kif ukoll il-metodi analitiċi u l-limiti tas-sejbien;

— il-metodi għall-karatterizzazzjoni/identifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni;

— devjazzjonijiet mill-protokoll tat-test jew mill-kondizzjonijiet tat-test, matul l-istudju.

Riżultati:

— dettalji fi stat oriġinali tal-figuri li jirrapreżentaw analiżi (id-dettalj kollha fi stat oriġinali għandhom ikunu maħżuna fl-arkivji-GLP);

— ir-repettabbilità u s-sensittività tal-metodi analitiċi użati;

— ir-rati ta' l-irkupru (% valuri għal studju validu huma mogħtija fis-sezzjoni 1.7.1);

— tabelli tar-riżultati espressi bħala % tad-doza applikata u fi mg.kg-1 fl-ilma, sediment u s-sistema totali (% biss) għas-sustanza tat-test u, jekk xieraq, għall-prodotti tat-trasformazzjoni u tar-radjoattività mhux-estrattibbli;

— il-bilanċ tal-massa, matul u qrib it-tmiem ta' l-istudji;

— rapreżentazzjoni grafika tat-trasformazzjoni fl-ilma u l-frazzjonijiet tas- sediment u fis-sistema totali (inkluża l-mineralizzazzjoni);

— rati tal-mineralizzazzjoni;

▼B

— in-nofs-ħajja, il- DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90} tas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-proddotti tat-trasfirmazzjoni maġġuri inklużi fil-limiti ta' l-affidabbilità fl-ilma, fis-sediment u fis-sistema totali;

— kalkolu tal-kinetiċi tat-trasformazzjoni għas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni;

— il-passaġġi proponuti tat-trasformazzjoni, meta xieraq;

— diskussjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

(1) Linja ta' Gwida BBA għall-eżaminazzjoni tal-protetturi tal-pjanti fil-progress tar-reġistrazzjoni. (1990). Parti IV, Sezzjoni 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/-sediment system. Il-Ġermanja.

(2) Kummissjoni għar-reġistrazzjoni tal-pestiċidi: L-Applikazzjoni għar-reġistrazzjoni tal-pestiċidi. (1991). Part G. Imġieba tal-prodott u l-metabiżmi tiegħu fil-ħamrija, fl-ilma u fl-arja, Sezzjoni G.2.1 (a). L-Olanda.

(3) MAFF Direttorat dwar is-Sigurtà tal-Pestiċidi. (1992). Linja ta' Gwida prelimari għall-imġieba tat-testijiet dwar il-biodegrabbilità tal-pestiċidi f'sistemi naturali ta' sediment/ilma. Ref No SC 9046. Renju Unit.

(4) Agrikoltura Kanada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038- 1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop “A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests”, 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigationextraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of 14C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

ANNESS 1

LINJA TA' GWIDA DWAR IS-SISTEMI TAS-TEST EROBIKU U ANEROBIKU

Sistema ta' test erobiku

Is-sistema tat-test erobiku deskritta f'dan il-metodu tat-test tikkonsisti minn saff ilma erobiku (konċentrazzjoni tipika ta' l-ossiġenu fil-medda bejn 7 u 10 $mg \cdot l^{-1}$) u saff tas-sediment, erobiku fil-wiċċ u anerobiku taħt il-wiċċ (medja tipika tal-potenzali redox (Eh) fiż-żona anerobika tas-sediment fil-medda minn –80 sa –190 mV). L-arja umida tkun mogħddiha matul il-wiċċ ta' l-ilma ta' kull unità ta' l-inkubazzjoni sabiex iżżomm ossiġenu suffiċjenti fl-ispazju ta' fuq.

Sistema ta' test anerobiku

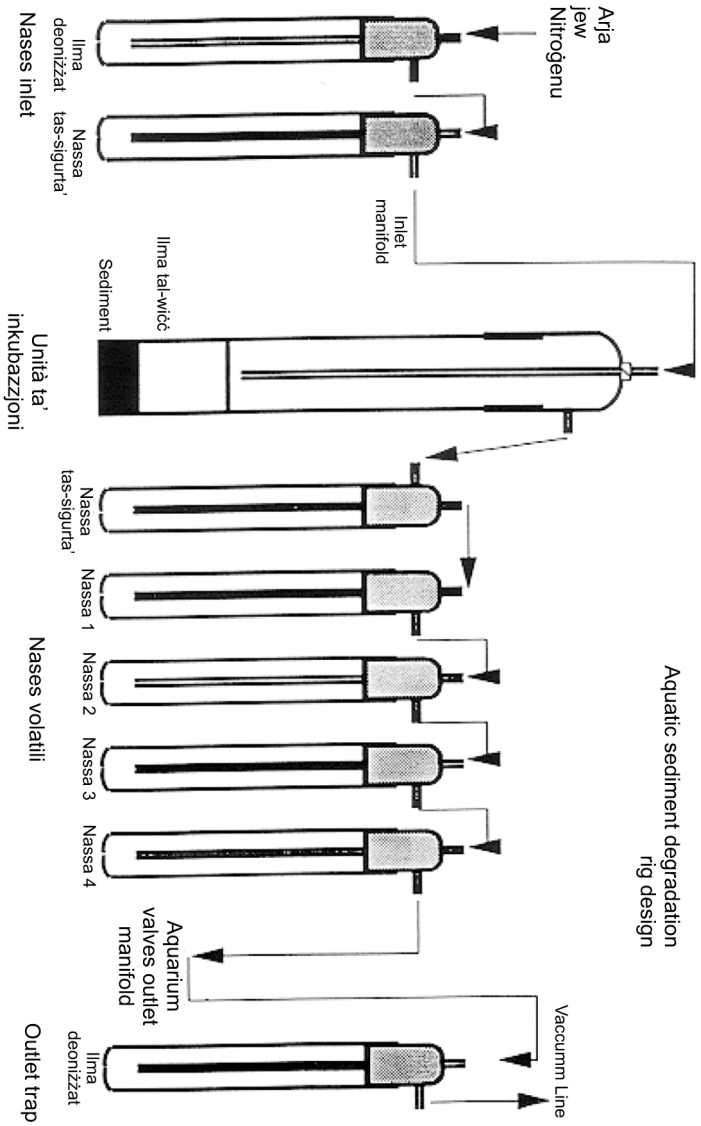
Għas-sistema tat-test anerobiku, il-proċedura tat-test hija essenzalment l-istess bħal dik elenkata għas-sistema erobika bl-eċċezzjoni li nitroġenu umidu jkun mogħddi minn fuq il-wiċċ ta' l-ilma f'kull unità ta' l-inkubazzjoni sabiex jinżamm spaziu fil-wiċċ bin-nitroġenu. Is-sediment u l-ilma huma meqjusa bħala anerobiċi la darba l-potenzal tar-redox (E_h) ikun aktar baxx minn –100 mV.

Fit-test anerobiku, l-assaġġ tal-mineralizzazzjoni jinkludi l-kejl tad-diossidu tal-karbonu u tal-metanju evoluti.

▼B

ANNESS 2

EŻEMPJU TA' L-APPARAT TAN-NIXXIJA KONTINWA TAL-GASS

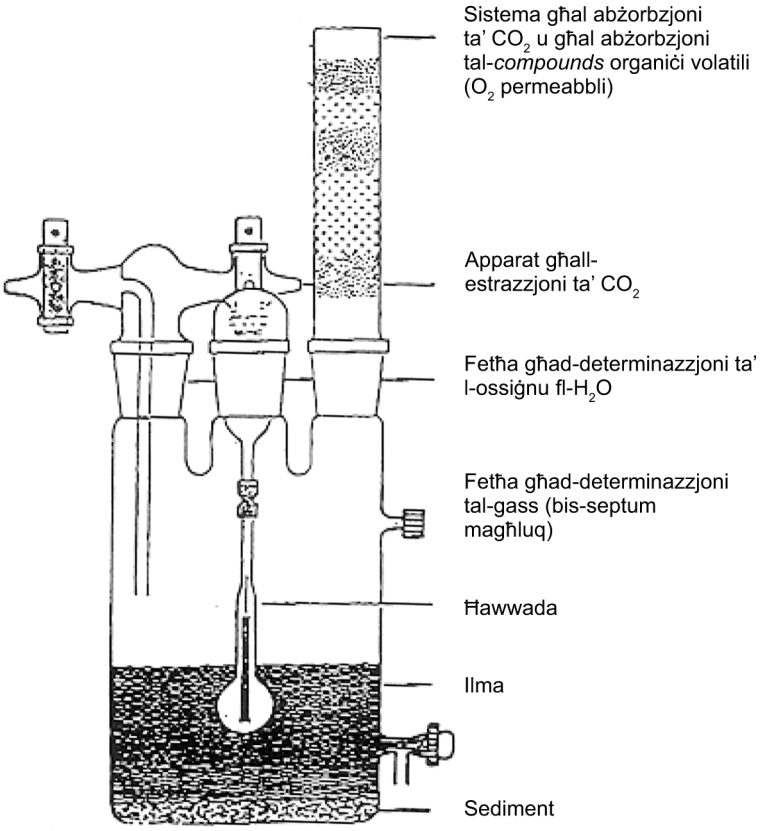


Nassa tas-sigurta', vojta
Nassa 1:
ethyleneglycol biex jinqabdu l-volatili organiċi
Nassa 2:
Aċdu solforiku 0.1 M biex jinqabdu l-volatili alkalini
Nassa 3 & 4:
Sodju hydroxide 2M biex jinqabad CO_2 u volatili aċidi oħra

▼B

ANNESS 3

EŻEMPJU TA' L-APPARAT BIOMETRIKU



Ħawwada manjetika

▼B

ANNESS 4

EŻEMPJU TAL-KALKOLU GĦALL-APPLIKAZZJONI TA' DOŻA MAR-REĊIPJENTI TAT-TEST

Diametru intern taċ-ċildru:	= 8 cm
Fond tal-kolonna ta' l-ilma li ma jinkludix is-sediment:	= 12 cm
Iż-żona tal-wiċċ 3,142 × 4^2	= 50,3 cm^2
Rata ta' l-applikazzjoni: 500 g sustanza tat-test/ha tikkorrespondi għal 5 μg/cm^2	
Total μg: 5 × 50,3	= 251,5 μg
Aġġusta l-kantità b'relazzjoni mal-fond ta' 100 cm:	
12 × 251,5 ÷ 100	= 30,18 μg
Kolonna tal-volum ta' l-ilma: 50,3 × 12	= 603 ml
Konċentrazzjoni fl-ilma 30,18 ÷ 603	= 0,050 μg/ml jew 50 μg/l

▼M1

C.25. MINERALIZZAZZJONI LI TEĦTIEĠ L-OSSIĠNU FL-ILMA TAL-WIĊĊ — TEST TAS-SIMULAZZJONI TAL-BIJODEGRADAZZJONI

1. METODU

Dan il-metodu hu ekwivalenti għall-*OECD* TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop ta' dan it-test hu li jkejjel iż-żmien meħtieġ għall-bijodegradazzjoni ta' sustanza użata għat-test b'konċentrazzjoni baxxa fl-ilma naturali li jkun jeħtieġ l-ossiġnu u biex jikkwantifika l-osservazzjonijiet f'forma ta' espressjonijiet tar-rata tal-moviment. Dan it-test simulatorju huwa test li jsir fil-laboratorju billi jiġi mħawwad ważett ħalli jkunu magħrufa r-rati ta' bijodegradazzjoni li teħtieġ l-ossiġnu ta' sustanzi organiċi f'kampjuni ta' ilma naturali tal-wiċċ (frisk, ftit mielaħ jew ilma baħar). Hu bbażat fuq l-ISO/DIS 14592-1 (2) u jinkludi wkoll elementi mill-metodi tat-test Ċ.23 u Ċ.24 (3)(4). Hemm l-għażla li, b'ħinijiet twal tat-test, operazzjoni semi-kontinwa tieħu post l-operazzjoni fuq grupp sabiex tipprevjeni d-deterjorament tal-mikrokosmu taħt test. L-għan prinċipali tat-test simulatorju hu biex tkun magħrufa l-mineralizzazzjoni tas-sustanza użata għat-test fl-ilma tal-wiċċ, u l-mineralizzazzjoni hi l-bażi ta' kif tiġi espressa d-dižintegrazzjoni tal-movimenti. Madankollu, it-test jista' jkollu għan ieħor sekondarju biex tinkiseb informazzjoni dwar id-dižintegrazzjoni ewlenija u l-formazzjoni ta' prodotti maġġuri ta' trasformazzjoni. L-identifikazzjoni ta' prodotti ta' trasformazzjoni, u fejn hu possibbli l-kwantifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tagħhom, huma tassew importanti għal sustanzi li jiġu mineralizzati bil-mod ħafna (eż. fil-każ ta' nofs ħajjiet għas-sustanzi totali li jifdal wara l-evaporazzjoni ^{14}C li jaqbżu is-60 ġurnata). Konċentrazzjonijiet ogħla tas-sustanza użata għat-test (eż., > 100 µg/l) għandhom jintużaw normalment biex ikunu identifikati u kwantifikati prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri minħabba limitazzjonijiet analitiċi.

Konċentrazzjoni baxxa f'dan it-test tfisser konċentrazzjoni (eż. inqas minn 1 µg/l sa 100 µg/l) li hi baxxa biżżejjed biex tiżgura li l-movimenti tal-bijodegradazzjoni miksuba fit-test jirriflettu dawk li wieħed jistenna li jkun hemm fl-ambjent. Meta mqabbla mal-piż totali tas-sottostrati tal-karbonju bijodegradabbli li hemm fl-ilma naturali użat għat-test, is-sustanza użata għat-test b'konċentrazzjoni baxxa se sservi bħala sottostrata oħra. Dan jimplika li l-movimenti tal-bijodegradazzjoni antiċipati huma tal-ewwel ordni (movimenti "li ma jikbrux") u li s-sustanza użata għat-test tista' tiġi ddegradata permezz ta' "kometaboliżmu". Movimenti tal-ewwel ordni jimplikaw li r-rata tad-dižintegrazzjoni (mg/L/kull ġurnata) hija proporzjonali mal-konċentrazzjoni tas-sottostrata li tonqos maż-żmien. Fil-każ tal-movimenti tal-ewwel ordni r-rata kostanti tad-dižintegrazzjoni speċifika, k, ma tiddependix fuq iż-żmien u l-konċentrazzjoni. Dan ifisser li, k ma tvarjax ħafna matul l-esperiment u lanqas tinbidel bil-konċentrazzjoni miżjuda waqt l-esperimenti. Skont id-definizzjoni, il-kostanti tar-rata tad-dižintegrazzjoni speċifika hija ugwali għall-bidla relattiva fil-konċentrazzjoni biż-żmien: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Għalkemm wieħed jistenna li l-movimenti tal-ewwel ordni jkunu normalment taħt il-kundizzjonijiet preskritti, jista' jkun hemm ċerti ċirkustanzi fejn movimenti oħra huma aktar addattati. Id-devjazzjonijiet mill-movimenti tal-ewwel ordni jistgħu eż. jiġu osservati jekk il-fenomeni tat-trasferiment tal-piż bħar-rata tat-tifrix, aktar milli r-rata tar-reazzjoni bijoloġika, tkun qed tillimita r-rata tal-bijotrasformazzjoni. Madankollu, id-data tista' kważi dejjem tkun deskritta minn movimenti tal-ewwel ordni li jixxiebhu li jaċċettaw kostanti tar-rata ta' konċentrazzjoni dipendenti.

▼M1

Informazzjoni dwar il-bijodegradabbiltà tas-sustanza użata għat-test f'konċentrazzjonijiet ogħla (eż. mit-testijiet standard ta' *screening*) kif ukoll informazzjoni dwar id-degradabbiltà li mhix ta' natura bijoloġika, prodotti ta' trasformazzjoni u karatteristiċi fiżiko-kemikali relevanti għandhom ikunu disponibbli qabel it-test biex ikun jista' jiġi stabbilit l-ippjanar esperimentali u jiġu interpretati r-riżultati. L-użu ta' sustanzi għat-test imsemmija ^{14}C u l-għarfien tal-faži tat-tqassim ta' ^{14}C fl-aħħar tat-test, għandhom jgħinu biex tkun magħrufa l-bijodegradabbiltà finali. Meta tkun użata sustanza għat-test li ma ngħatatx isem, il-bijodegradazzjoni finali tista' tkun stmata biss jekk tiġi ttestjata konċentrazzjoni ogħla u l-prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri kollha jkunu magħrufa.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Bijodegradazzjoni primarja: Il-bidla strutturali (trasformazzjoni) ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi li twassal biex tintilef l-identità kimika.

Bijodegradazzjoni funzjonali: Il-bidla strutturali (trasformazzjoni) ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi li twassal biex tintilef karatteristika speċifika.

Bijodegradazzjoni li tkun teħtieġ l-ossiġnu finali: Id-diżintegrazzjoni ta' sustanza kimika mill-mikroorganiżmi meta jkun hemm l-ossiġnu mal-karbonju diossidu, l-ilma u l-melħ minerali u xi elementi oħra (mineralizzazzjoni) preżenti u l-ħolqien tal-piż totali ta' l-organiżmi u prodotti organiċi li fihom bijosinteżi tal-mikroorganiżmi ġodda.

Mineralizzazzjoni: Id-diżintegrazzjoni ta' sustanza kimika f'materja organika minħabba l-mikroorganiżmi li hemm fl-ossiġnu mal-karbonju diossidu, l-ilma u l-melħ minerali ta' xi elementi oħra preżenti.

Faži tad-dewmien: Il-ħin minn meta jibda test sakemm jintlaħaq l-addattament tad-degradar tal-mikro organiżmi u l-ammont ta' bijodegradazzjoni ta' sustanza kimika jew materja organika żdied għal livell li jista' jkun magħruf (eż. 10 % tal-bijodegradazzjoni teoretika massima, jew inqas, jiddependi minn kemm hi preċiża t-teknika tal-kejl).

Livell massimu ta' bijodegradazzjoni: L-ammont ta' bijodegradazzjoni ta' sustanza kimika jew materja organika f'test, irrekordjata f'perċentwal, li 'l fuq minnu ma ssirx aktar bijodegradazzjoni waqt it-test.

Sottostrata primarja: Ġabra ta' karbonju naturali u sorsi ta' enerġija li jkabbru u jżommu l-piż totali tal-organiżmi mikrobjali.

Sottostrata sekondarja: Komponent tas-sottostrata li hemm f'dik il-konċentrazzjoni baxxa, li bid-diżintegrazzjoni tiegħu, ammonti żgħar ħafna ta' karbonju u enerġija jiġu mgħoddija lill-mikroorganiżmi kompetenti, meta mqabbla mal-karbonju u l-enerġija mogħtija mid-diżintegrazzjoni tal-komponenti tas-sottostrata ewlenija (sottostrati primarji).

Ir-rata tad-diżintegrazzjoni kostanti: Rata tal-moviment kostanti tal-ewwel ordni jew li tixbaħha, k (d^{-1}), li tindika r-rata tal-proċessi tad-diżintegrazzjoni. Għal esperiment fuq grupp k hi stmata mill-parti tal-bidu tal-kurva tad-diżintegrazzjoni miksuba wara li tintemm il-faži tad-dewmien.

Nofs ħajja, $t_{1/2}$ (d): Terminu użat biex jikkaratterizza r-rata tar-reazzjoni tal-ewwel ordni. Hu l-intervall tal-ħin li jikkorrispondi għal tnaqqis fil-konċentrazzjoni b'fattur 2. In-nofs ħajja u l-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni huma marbuta ma' l-ekwazzjoni $t_{1/2} = \ln 2/k$.

▼M1

Il-brejk tad-diżintegrazzjoni, DT_{50} (d): Terminu użat biex jikkwantifika r-riżultat tat-testijiet tal-bijodegradazzjoni. Huwa l-intervall ta' ħin, inkluż il-fażi tad-dewmien, meħtieġ biex jintlaħaq valur ta' 50 % bijodegradazzjoni.

Il-limitu tal-għarfien (*LOD*) u l-limitu tal-kwantifikazzjoni (*LOQ*): Il-limitu tal-għarfien (*LOD*) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza li 'l isfel minnu l-identità tas-sustanza ma tkunx tista' tintgħaraf mill-karatteristiċi li ddaħħlu fil-preparazzjoni għall-analiżi. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza li 'l isfel minnu l-konċentrazzjoni ma tistax tkun magħrufa bi preċiżjoni aċċettabbli.

Karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*): Dik il-parti tal-karbonju organiku f'kampjun ta' ilma li ma tistax titneħħa b'fażi ta' separazzjoni speċifika, per eżempju b'azzjoni ċentrifuga permezz ta' magna f'40 000 ms^{-2} għal 15-il min jew bl-iffiltrar tal-membrana billi jintużaw membrani li fihom pori b'dijametru ta' 0,2 μm-0,45 μm.

L-attività organika ^{14}C totali (*TOA*): L-attività totali ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku.

L-attività organika ^{14}C maħlula fl-ilma (*DOA*): L-attività totali organika ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku maħlul fl-ilma.

L-attività organika ^{14}C f'forma ta' *partikuli* separati (*POA*): L-attività totali ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku f'forma ta' *partikuli* separati.

1.3. APPLIKABILITÀ TAT-TEST

Dan it-test simulatorju japplika għal sustanzi organiċi li ma jevaporawx malajr jew jevaporaw xi ftit malajr ittestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. Permezz ta' fliexken miftuħa għall-arja (eż. tajjar imdeffes), sustanzi bil-kostanti tar-regola ta' *Henry* inqas minn madwar 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (madwar 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) jistgħu jitqiesu li ma jevaporawx malajr fil-prattika. Permezz ta' fliexken magħluqa bl-ispazju fuq, hu possibbli li jiġu ttestjati sustanzi li ma tantx jevaporaw malajr (bil-kostanti tar-regola ta' *Henry* < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ jew < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) mingħajr telf fis-sistema tat-test. Jista' jkun hemm telf tas-sustanzi msejħa ^{14}C, jekk ma jittieħdux il-prekawzjonijiet ġusti, meta jitneħħa s-CO_2. F'dawk is-sitwazzjonijiet, jista' jkun hemm bżonn li s-CO_2 jinqabad ġo assorbitur intern bl-*alkali* jew li tintuża sistema esterna li tassorbi s-CO_2 (għarfien dirett tal-$^{14}CO_2$; ara Anness 3). Biex ikunu magħrufa l-movimenti tal-bijodegradazzjoni, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza użata għat-test iridu jkunu taħt meta tinħall fl-ilma. Ta' min jinnota, iżda, li l-valuri tal-letteratura ta' meta jinħall fl-ilma jistgħu jkunu ogħla sew minn meta tinħall is-sustanza użata għat-test fl-ilmijiet naturali. Hemm l-għażla li tiġi stabbilita s-solubilità ta' sustanzi tat-test partikolari li ma tantx jinħallu fl-ilma permezz tal-ilmijiet naturali li jkunu qed jiġu ttestjati.

Il-metodu jista' jkun użat biex tiġi simulata l-bijodegradazzjoni fl-ilma tal-wiċċ li ma jkunx fih partikuli ħorox ("test li jsir fil-baħar miftuħ") jew fil-wiċċ tal-ilma mhux ċar, eż. li jista' jkun hemm ħdejn post fejn l-ilma jiltaqa' man-naqal ("test sospiż tan-naqal").

▼**M1**

1.4. IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

It-test isir fi grupp billi s-sustanza użata għat-test tiġi żviluppata fiha l-batteri jew mill-ilma tal-wiċċ biss (“test li jsir fil-baħar miftuħ”) jew ilma miżjud b'solidi/naqal miżmuma x’imkien bejn il-qiegħ u fuq ta' 0,01 sa lg/L użin xott (“test sospiż” tan-naqal biex ikun jixbah *body* tal-ilma miżmuma x’imkien bejn il-qiegħ u fuq jew naqal li jerġa’ jkun sospiż bejn il-qiegħ u fuq. Is-solidi miżmuma x’imkien bejn il-qiegħ u fuq/il-konċentrazzjoni tan-naqal fil-firxa t'isfel ta' dan l-intervall hi tipika għal ħafna ilmijiet fil-wiċċ. Il-fliexken tat-test tiżviluppata fihom batteri fid-dlam f’temperatura ambjentali taħt kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu u l-aġitazzjoni. Tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test għandhom jintużaw sabiex jiġu ddeterminati l-movimenti tad-diżintegrazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet għandhom ivarjaw minn xulxin b’fattur ta’ 5 sa 10 u għandhom jirrappreżentaw il-firxa mistennija ta’ konċentrazzjonijiet fl-ambjent. Il-konċentrazzjoni massima tas-sustanza tat-test m’għandhiex teċċedi 100 µg/L, iżda l-konċentrazzjonijiet massimi tat-test taħt 10 µg/L jew inqas huma preferuti biex ikun żgurat li l-bijodegradazzjoni ssegwi l-movimenti tal-ewwel ordni. L-ibaxx konċentrazzjoni m’għandhiex teċċedi 10 µg/L, iżda l-ibaxx konċentrazzjonijiet tat-test ta’ 1-2 µg/L jew inqas minn 1 µg/L huma preferuti. Normalment analiżi adegwata ta’ dik il-konċentrazzjoni baxxa tista’ tintlaħaq bl-użu ta’ sustanzi msejħa ^{14}C li ssib tixtrihom. Minħabba l-limitazzjonijiet analitiċi, ta’ spiss ikun impossibbli li titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test bil-preċiżjoni meħtieġa, jekk is-sustanza tat-test hi applikata f’konċentrazzjoni ta’≤ 100 µg/L (ara t-tieni paragrafu f’sezzjoni 1.7.2.). Konċentrazzjonijiet oġħla ta’ sustanzi użati għat-test (> 100 µg/L u xi kultant > 1 mg/L) jistgħu jintużaw għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni ta’ prodotti ta’ trasformazzjoni maġġuri jew jekk m'hemmx metodu ta’ analiżi speċifiku b’limitu baxx li jidditektja. Jekk ikunu ttestjati konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, jista’ ma jkunx possibbli li r-riżultati jintużaw biex tkun stmata l-kostanti tad-diżintegrazzjoni tal-ewwel ordni u n-nofs ħajja, għax id-diżintegrazzjoni probabbilment ma ssegwix il-movimenti tal-ewwel ordni.

Id-diżintegrazzjoni tkun segwita f’intervalli tal-ħin addattati, billi titkejjel jew is-sustanza li jkun fadal wara l-evaporazzjoni ^{14}C jew il-konċentrazzjoni li jkun fadal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test meta tintuża analiżi kimika speċifika. L-għoti tal-isem ^{14}C tal-aktar parti stabbli tal-molekula jiżgura li tkun determinata l-mineralizzazzjoni totali, filwaqt li l-għoti ta' l-isem ^{14}C ta’ parti inqas stabbli tal-molekula, kif ukoll l-użu ta’ analiżi speċifika, jagħti lok għal evalwazzjoni tal-bijodegradazzjoni primarja biss. Madankollu, l-aktar parti stabbli mhux neċessarjament tinkludi n-nofs funzjonali relevanti tal-molekula (li tista' tkun relatata ma' karatteristika speċifika bħat-tossiċità, il-bijoakkumulazzjoni, eċċ.) Jekk hekk ikun il-każ, ikun xieraq li tintuża sustanza tat-test, imsemmija ^{14}C, fil-parti funzjonali sabiex issegwi t-tneħħija tal-karatteristika speċifika.

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Kemm is-sustanzi tat-test li ġew immarkati permezz ta' raġġi (*radio-labelled*)kif ukoll dawk li ma ġewx mogħtija isem jistgħu jintużaw f'dan it-test. It-teknika tal-għoti tal-isem ^{14}C hi rakkomandata u l-għoti tal-isem għandu jsir normalment fl-aktar parti(jiet) stabbli tal-molekula (ara anki sezzjoni 1.4.). Għal sustanzi li fihom aktar minn ċirku li mhux saturizzat bl-umdità, karbonju wieħed jew aktar f’kull ċirku għandu preferebbilment ikun mogħti l-isem ^{14}C. Barra minn hekk, karbonju wieħed jew aktar fuq iż-żewġ naħat ta’ għaqdiet li jistgħu jiġu diżintegrati faċilment għandhom preferibbilment ikollhom l-isem ^{14}C. Il-purità kimika u/jew radjokimika tas-sustanza tat-test għandha tkun > 95 %. Għal sustanzi mmarkati permezz ta’ raġġi, attività speċifika ta’ madwar 50 µCi/mg (1,85 MBq) jew aktar hi preferuta sabiex tiffaċilita l-kejl ^{14}C f’testijiet li jsiru b’konċentrazzjonijiet baxxi fil-bidu. Għandu jkun hemm l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza użata għat-test:

▼**M1**

— is-solubilità fl-ilma [Metodu A6];

— is-solubilità f'aġent(i) organiku li jinħall (sustanzi applikati bl-aġent li jinħall jew li ma tantx jinħallu fl-ilma);

— il-kostanti dikompost (pKa) jekk is-sustanza għandha tendenza għal *protonation* jew *deprotonation* [*OECD TG* 112] (5);

— il-pressjoni tal-fwar [Metodu A.4] u l-liġi ta' *Henry* kostanti;

— stabbilità kimika fl-ilma u fid-dlam (idrolisi) [Metodu C.7].

Meta sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma jkunu qed jiġu ttestjati fl-ilma baħar, ta' min ikun jaf il-kostanti tat-tneħħija tal-melħ (jew "il-kostanti *Setschenow*") K^s, li huma mfissra permezz tal-espressjoni: log (S/S') = K^s C_m, fejn S u S' huma kemm tinħall is-sustanza fl-ilma pur u l-ilma baħar, rispettivament, u C_m hija l-konċentrazzjoni *molar* tal-melħ.

Jekk it-test isir bħala "test tan-naqal miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u fuq" l-informazzjoni li ġejja għandha tkun disponibbli:

— koeffiċjent tad-diviżjoni *n-octanol*/ilma [Metodu A.8];

— koeffiċjent ta' kemm il-molekuli jżommu fil-wiċċ ta' likwidu (*absorption coefficient*) [Metodu C.18];

Informazzjoni oħra utli tista' tinkludi:

— il-konċentrazzjoni ambjentali, jekk tkun magħrufa jew stmata;

— it-tossiċità tas-sustanza użata għat-test għall-mikroorganiżmi [Metodu C.11];

— bijodegraddibiltà lesta u/jew li teżisti fiha [Metodi C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)];

— studji dwar il-bijodegradabbiltà li teħtieġ l-ossiġnu fl-ilma jew li ma teħtieġx ossiġnu fil-ħamrija u fil-bidla tan-naqal/l-ilma [Metodi C.23, C.24].

1.6. SUSTANZA UŻATA BĦALA REFERENZA

Sustanza, li tista' tiddiżintegra faċilment f'kundizzjonijiet li jkunu jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma (eż. l-*aniline* jew *is-sodium benzoate*) għandha tintuża bħala sustanza ta' referenza. L-intervall ta' ħin mistenni għad-diżintegrazzjoni tal-*aniline* u tas-*sodium benzoate* huwa normalment inqas minn ġimagħtejn. L-iskop tas-sustanzi użati bħala referenza hu li jkun żgurat li l-attività tal-mikroorganiżmi ta' l-ilma użat għat-test hi f'ċerti limiti; jiġifieri li l-ilma fih popolazzjoni attiva ta' mikroorganiżmi.

▼M1

1.7. KRITERJI DWAR IL-KWALITA'

1.7.1. **Irkuprar**

Hekk kif tiġi miżjuda s-sustanza użata għat-test, kull test tal-konċentrazzjoni tal-bidu għandu jiġi vverifikat billi titkejjel l-attività ^{14}C, jew permezz ta' analiżi kimika fil-każ ta' sustanzi li m'għandhomx isem, f'tal-inqas kampjuni doppji. Dan jagħti informazzjoni dwar kemm għandu jkun applikat u kemm għandu jiġi mtenni l-metodu analitiku kif ukoll dwar kemm hu uniformi t-tqassim tas-sustanza użata għat-test. Normalment, l-attività ^{14}C inizjali jew il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jintużaw fl-analiżi sussegwenti tad-data aktar milli l-konċentrazzjoni nominali bħala telf minħabba s-*sorption* u żbalji fid-daqs tad-doża jiġu kumpensati. Għas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C, il-livell ta' irkuprar fl-aħħar tal-esperiment hu mogħti bil-bilanċ fil-piż (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.4). Idealment, il-bilanċ tal-piż immarkat permezz ta' raġġi għandu jestendi minn 90 % għal 110 %, filwaqt li l-preċiżjoni analitika għandha twassal għal irkuprar tal-bidu bejn 70 % u 110 % għal sustanzi tat-test li m'għandhomx isem. Dawn il-firxiet għandhom ikunu interpretati bħala miri u m'għandhomx jintużaw bħala kriterji biex jiġi aċċettat it-test. Il-preċiżjoni analitika tista' tiġi ddeterminata ukoll għas-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni ibaxx mill-konċentrazzjoni tal-bidu u għall-prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri.

1.7.2. **Kemm għandu jiġi mtenni u kemm hu sensittiv il-metodu analitiku**

Kemm għandu jiġi mtenni l-metodu analitiku (inkluż l-effiċjenza tal-estrazzjoni tal-bidu) biex tiġi kwantifikata s-sustanza tat-test, u l-prodotti ta' trasformazzjoni, jekk jixraq, għandu jkun iċċekkjat billi jkun hemm ħames analiżi l-istess tal-estratti individwali tal-ilma tal-wiċċ.

Il-limitu ta' għarfien (*LOD*) tal-metodu analitiku għas-sustanza użata għat-test u għall-prodotti ta' trasformazzjoni għandu jkun tal-inqas 1 % tal-ammont tal-bidu applikat lis-sistema tat-test jekk hu possibbli. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (*LOQ*) għandu jkun daqs jew inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni applikata. L-analiżi kimika ta' ħafna sustanzi organiċi u l-prodotti tat-trasformazzjoni tagħhom ta' spiss jeħtieġu li s-sustanza użata għat-test tkun applikata f'konċentrazzjoni kemm xejn għolja, jiġifieri > 100 µg/L.

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.8.1. **Tagħmir**

It-test jista' jsir fi fliexken forma ta' lembut jew forma ta' ċilindru tad-daqs addattat (eż. li jesgħu 0,5 jew 1,0 litru) magħluqa b'tappijiet tas-silikon jew lastku, jew fi fliexken tas-*serum* b'għotjien li ma joħroġx minnhom CO_2 (eż. b'għeluq tal-lastku sintetiku). Inkella t-test jista' jsir bl-użu ta' ħafna fliexken u bl-osservazzjoni tal-konsegwenzi tal-fliexken kollha, ta' l-inqas darbtejn, f'kull intervall tal-kampjuni (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1). Għas-sustanzi tat-test li ma jevaporawx malajr u li mhumiex immarkati bir-raġġi, m'hemmx bżonn ta' tappijiet jew għotjien li ma joħroġx gass minnhom; biċċiet tat-tajjar li ma jagħtux lok li jkun hemm kontaminazzjoni mill-arja huma addattati (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1.). Sustanzi li ma tantx jevaporaw malajr għandhom ikunu ttestjati f'sistema tat-tip tal-*bijometer* billi jitħawwad bil-mod l-ilma tal-wiċċ. Biex ikun żgurat li ma ssirx kontaminazzjoni mill-batterji, il-kontenituri jistgħu jiġu sterilizzati billi jissaħħnu jew jiġu stimjati qabel ma jintużaw. Barra minn hekk, it-tagħmir standard tal-laboratorju li ġej huwa użat:

— mejda li tittriegħed jew oġġetti li jħalltu manjetiċi biex ikun hemm ċaqliq kontinwu tal-fliexken użati għat-test,

▼M1

— magna ċentrifuga,

— pH meter,

— *turbidimeter* biex ikejjel konċentrazzjoni tal-frak tat-tajn,

— forn jew majkrowejv biex ikun magħruf il-piż xott,

— apparat li jissepara l-membrana,

— sterilizzatur li juża' stim bi pressjoni għolja jew forn biex jisterilizza bis-sħana l-kontenituri tal-ħġieġ,

— faċilitijiet biex jimmaniġġjaw is-sustanzi mmarkati ^{14}C,

— tagħmir biex tiġi kwantifikata l-attività ^{14}C f'kampjuni mit-taħlitiet li jaqbdu s-CO_2 u, jekk hemm bżonn, mill-kampjuni tan-naqal,

— tagħmir analitiku biex tkun magħrufa s-sustanza użata għat-test (jew is-sustanza ta' referenza) jekk tintuża' analiżi kimika speċifika (eż. dak li jifred il-gass f'taħlita, dak li jifred il-likwidu bi pressjoni għolja).

1.8.2. **Taħlitiet tal-kwantità tas-sustanza tat-test**

Ilma mingħajr *ions* użat biex jiġu ppreparati t-taħlitiet tal-kwantità tat-test u s-sustanzi ta' referenza (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.7). L-ilma mingħajr *ions* m'għandux ikun fih sustanzi li jistgħu jkunu tossiċi għall-mikroorganiżmi, u l-karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*) m'għandux ikun aktar minn 1 mg/L (6).

1.8.3. **Ġbir u ġarr tal-ilma tal-wiċċ**

Il-post fejn jittieħdu l-kampjuni għall-ġbir tal-ilma tal-wiċċ għandu jintgħażel skont l-għan tat-test f'kull sitwazzjoni partikolari. Meta jintgħażlu l-postijiet fejn għandhom jittieħdu l-kampjuni, għandha titqies l-istorja ta' kontribut agrikolu, industrijali jew domestiku li jista' jkun hemm. Jekk ikun magħruf li ambjent akwatiku ġie kkontaminat bis-sustanza tat-test jew l-analogu struttuturali tagħha fl-erba' snin ta' qabel, m'għandux jintuża' għall-ġbir ta' ilma għat-test, sakemm l-investigazzjoni tar-rati ta' diżintegrazzjoni f'postijiet li kienu esposti qabel huwa l-għan dikjatur ta' l-investigatur. Il-*pH* u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu mkejla fil-post tal-ġbir. Barra minn hekk, il-fond tat-teħid tal-kampun u d-dehra tal-kampjun tal-ilma (eż. kulur u nuqqas ta' ċarezza) għandhom jiġu nnutati (ara sezzjoni 3). Il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu u/jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis fl-ilma u fis-saff tan-naqal tal-wiċċ għandu jitkejjel sabiex juri l-kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma sakemm dan ma jkunx ovvju mid-dehra u mill-esperjenza storika tal-post. L-ilma tal-wiċċ għandu jinġarr f'kontenitur li hu mnaddaf sew. Waqt il-ġarr, it-temperatura tal-kampjun m'għandhiex teċċedi b'mod sinifikanti t-temperatura użata fit-test. Hu rakkomandat li tiġi mkessħa għal temperatura ta' 4 °C waqt il-ġarr jekk idum aktar minn 2 jew 3 sigħat. Il-kampjun tal-ilma m'għandux ikun iffriżat.

▼M1

1.8.4. **Il-ħżin u l-preparazzjoni tal-ilma tal-wiċċ**

It-test għandu jibda preferibbilment fi żmien ġurnata wara li jinġabar il-kampjun. Il-ħżin tal-ilma, jekk hemm bżonn, għandu jkun minimizzat u għall-ebda raġuni m'għandu jaqbeż massimu ta' 4 ġimgħat. Il-kampjun tal-ilma għandu jinżamm f'temperatura ta' 4 °C iċċarġjat b'gas sakemm jintuża. Qabel ma jintuża, il-partijiet l-irqaq ħorox għandhom jitneħħew, eż. billi jiġu iffiltrati minn ġo filter tan-najlon li x-xibka tiegħu tkun daqs 100 μm jew b'filter tal-karta ħoxna, jew billi jitħalla joqgħod ħalli n-naqal jinżel fil-qiegħ.

1.8.5. **Il-preparazzjoni tal-ilma miżjud bin-naqal (mhux obbligatorja)**

Għat-test tan-naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, in-naqal tal-wiċċ jiġi miżjud fil-fliexken li fihom ilma naturali (iffiltrat biex jitneħħew il-frak ħorox kif deskritt fis-sezzjoni 1.8.4.) biex tinkiseb is-sospensjoni; il-konċentrazzjoni ta' solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u fuq għandha tkun bejn 0,01 u 1 g/L. In-naqal tal-wiċċ għandu jkun ta' l-istess post minn fejn ittieħed il-kampjun ta' l-ilma. Skont l-ambjent akwatiku partikulari, in-naqal tal-wiċċ jista' jew ikun karatterizzat minn kontenut għoli ta' karbonju organiku (2.5-7.5 %) u konsistenza fina jew minn kontenut baxx ta' karbonju organiku (0.5-2.5 %) u konsistenza ħarxa (3). In-naqal tal-wiċċ jista' jiġi preparat kif ġej: ħu diversi biċċiet min-nofs tan-naqal billi tuża tubu trasparenti tal-plastik, neħħilu s-saffi ta' fuq li jeħtieġu l-ossiġnu (mill-wiċċ sa fond ta' massimu ta' 5 mm) eżatt wara li jittieħed il-kampjun u itfagħhom flimkien. Il-kampjun li joħroġ tan-naqal għandu jinġarr ġo kontenitur li l-parti ta' fuq tiegħu hi kbira biżżejjed għall-arja biex iżomm lin-naqal f'kundizzjonijiet li jeħtieġu l-ossiġnu (kessħu għal 4 °C jekk il-ġarr idum aktar minn 2-3 sigħat). Il-kampjun tan-naqal għandu jinżamm bejn il-qiegħ u l-wiċċ fl-ilma tat-test fi proporzjon ta' 1:10 u jinżamm f'temperatura ta' 4 °C iċċarġjat bil-gass sakemm jintuża. Il-ħżin tan-naqal, jekk hemm bżonn, għandu jkun minimizzat u m'għandux jaqbeż massimu ta' 4 ġimgħat.

1.8.6. **Proċedura semi-kontinwa (mhux obbligatorja)**

L-inkubazzjoni fit-tul (diversi xhur) tista' tkun meħtieġa jekk il-perjodu tad-dewmien isir qabel ma tkun tista' titkejjel diżintegrazzjoni sinifikanti tas-sustanza tat-test. Jekk din tkun magħrufa minn testijiet imgħoddija tas-sustanza, it-test jista' jinbeda permezz tal-proċedura semi-kontinwa, li tagħti lok għal tiġdid perjodiku ta' parti mill-ilma tat-test jew mis-sospensjoni (ara Anness 2). Inkella, it-test normali fuq grupp jista' jinbidel b'test semi-kontinwu, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test intlaħqet matul madwar 60 ġurnata ta' testjar billi ntużat il-proċedura tal-grupp (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.8.3).

1.8.7. **Żieda tas-sustanza tat-test (jew ta' referenza)**

Għal dawk is-sustanzi li jinħallu malajr fl-ilma (> 1 mg/L) u jevaporaw ftit (bir-regola ta' *Henry* kostanti < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ jew < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), taħlita tal-kwantità tista' tiġi ppreparata fl-ilma mingħajr *ions* (ara sezzjoni 1.8.2); il-volum addattat tal-kwantità jiġi miżjud fil-kontenituri tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni mixtieqa. Il-volum ta' xi kwantità tat-taħlita għandu jkun il-minimu prattiku (< 10 % tal-volum tal-likwidu finali, jekk jista' jkun). Proċedura oħra hi li s-sustanza tat-test tiġi maħlula f'volum akbar ta' ilma tat-test, li tista' tidher bħala alternattiva għall-użu ta' aġenti orġaniċi li jinħallu.

▼M1

Jekk ma jkunx possibbli, it-taħlitiet tal-kwantità ta' sustanzi li ma jevaporawx malajr u li ma jinħallux malajr fl-ilma għandhom ikunu preparati permezz ta' aġent organiku li jinħall u li jevapora malajr, iżda l-ammont tal-aġent li jinħall miżjuda mas-sistema tat-test m'għandux jeċċedi il-1 % v/v u m'għandux iħalli effetti ħżiena fuq l-attività tal-mikroorganiżmi. L-aġent li jinħall m'għandux jaffettwa l-istabbilità tas-sustanza tat-test fl-ilma. L-aġent li jinħall m'għandux jitneħħa fi kwantità żgħira tant li ma żżidx b'mod sinifikanti l-konċentrazzjoni *DOC* ta' l-ilma tat-test jew is-sospensjoni. Dan għandu jkun iċċekkjat bl-analiżi tas-sustanza speċifika jew, jekk jista' jkun, permezz ta' analiżi *DOC* (6). Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi llimitat l-ammont ta' aġent li jinħall trasferit għal dak li hu assolutament neċessarju, u biex ikun żgurat li l-ammont tas-sustanza tat-test tista' tinħall fil-volum finali ta' l-ilma tat-test. Jistgħu jintużaw tekniki oħra biex tiddaħħal is-sustanza tat-test fil-kontenituri tat-test kif deskritt f'(7) u (8). Meta aġent organiku li jinħall jintuża għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, il-kontrolli tal-aġent li jinħall li fihom l-ilma tat-test (mingħajr żidiet) u l-ilma tat-test bis-sustanza ta' referenza miżjuda għandhom ikunu ttrattati bl-istess mod bħall-kontenituri attivi tat-test miżjuda bis-sustanza tat-test f'dak li jġorr l-aġent li jinħall. L-iskop tal-kontrolli tal-aġent li jinħall hu biex jiġu eżaminati xi effetti negattivi li jistgħu jkunu kkawżati mill-aġent li jinħall fuq il-popolazzjoni tal-mikroorganiżmi kif indikat mid-diżintegrazzjoni tas-sustanza ta' referenza.

1.8.8. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.8.8.1. *Temperatura tat-test*

L-inkubazzjoni għandha ssir fid-dlam (preferibbilment) jew f'dawl batut b'temperatura kkontrollata (± 2 °C), li tista' tkun it-temperatura tal-esperiment jew it-temperatura standard ta' 20-25 °C. It-temperatura tal-esperiment tista' tkun jew it-temperatura proprja tal-kampjun ta' meta jittieħed il-kampjun jew it-temperatura medja tal-esperiment fil-post fejn jittieħed il-kampjun.

1.8.8.2. *Ċaqliq*

Iċ-ċaqliq permezz ta' ċaqliq jew tħawwid kontinwu għandu jsir biex il-partikuli ż-żgħar u l-mikroorganiżmi jkunu miżmuma xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ. Iċ-ċaqliq jgħin ukoll biex jiġi trasferit l-ossiġnu mill-parti ta' fuq għal-likwidu sabiex il-kundizzjonijiet fejn ikun meħtieġ l-ossiġnu jistgħu jinżammu b'mod adegwat. Qiegħed il-fliexken fuq mejda li titriegħed (madwar 100 rpm ta' ċaqliq) jew uża xi ħaġa manjetika biex tħawwad. Iċ-ċaqliq irid ikun kontinwu. Iżda, iċ-ċaqliq jew it-tħawwid għandu jsir bil-mod kemm jista' jkun, filwaqt li jinżamm f'livell uniformi x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

1.8.8.3. *Tul tat-test*

It-test m'għandux idum aktar minn 60 jum sakemm ma tkunx qed tiġi applikata l-proċedura semi-kontinwa bit-tiġdid perjodiku tat-test ta' sospensjoni (ara sezzjoni 1.8.6 u Anness 2). Madankollu, il-perjodu tat-test għat-test tal-grupp jista' jkun estiż għal massimu ta' 90 ġurnata, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test bdiet fl-ewwel 60 jum. Id-diżintegrazzjoni hi monitorjata, f'intervalli tal-ħin addattati, billi tkun magħrufa l-attività ^{14}C tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni jew $^{14}CO_2$ evolut (ara sezzjoni 1.8.9.4) u/jew permezz ta' analiżi kimika (sezzjoni 1.8.9.5). Il-ħin tal-inkubazzjoni għandu jkun twil biżżejjed biex jevalwa l-proċess ta' diżintegrazzjoni. L-ammont ta' diżintegrazzjoni preferibbilment għandu jeċċedi 50 %; għas-sustanzi li jiddiżintegraw bil-mod, l-ammont ta' diżintegrazzjoni għandu jkun biżżejjed (normalment aktar minn 20 % diżintegrazzjoni) sabiex jiżgura li tiġi stmata r-rata kostanti ta' diżintegrazzjoni tal-moviment.

▼M1

Kejl perjodu tal-*pH* u l-konċentrazzjoni tal-ossiġnu fis-sistema tat-test għandu jsir sakemm dan ma jkunx meħtieġ minħabba esperjenzi mgħoddija minn testi simili bil-kampjuni ta' l-ilma u n-naqal miġbura mill-istess post. Taħt xi kundizzjonijiet, il-metaboliżmu tas-sottostrati primarji f'konċentrazzjonijiet aktar għolja fl-ilma jew in-naqal jistgħu jwasslu għall-evoluzzjoni biżżejjed tas-CO_2 u t-tneħħija tal-ossiġnu biex li jbiddlu b'mod sinifikanti l-kundizzjonijiet esperimentali waqt it-test.

1.8.9. **Il-Proċedura**

1.8.9.1. *Il-preparazzjoni tal-fliexken għat-test fil-baħar miftuħ*

Ittrasferixxi volum addattat ta' ilma tat-test fil-fliexken tat-test, sa qisu terz tal-volum tal-flixkun u mhux anqas minn madwar 100 ml. Jekk jintużaw diversi fliexken (biex ikunu jistgħu jiġu magħrufa l-konsegwenzi tal-fliexken kollha kull meta jittieħdu l-kampjuni), il-volum addattat tal-ilma tat-test hu kważi wkoll ta' madwar 100 ml, għaliex volumi żgħar tal-kampjuni jistgħu jinfluwenzaw it-tul tal-fażi tad-dewmien. Is-sustanza tat-test hi miżjuda mit-taħlita tal-kwantità kif deskritta fis-sezzjonijiet 1.8.2 u 1.8.7. Tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test li jvarjaw b'fattur ta' 5 sa 10 għandhom jintużaw sabiex ikunu magħrufa l-movimenti tad-diżintegrazzjoni u biex tiġi kalkolata r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni tal-moviment. Iż-żewġ konċentrazzjonijiet magħżula għandhom ikunu inqas minn 100 μg/L u preferibbilment inqas minn < 1-10 μg/L.

Agħlaq il-fliexken bit-tappijiet jew għotjien li minnhom ma tistax tgħaddi arja u CO_2. Għall-kimiċi tat-test li ma jevaporawx ta' ^{14}C li m'għandhomx isem, biċċiet tat-tajjar huma addattati biex jintużaw bħala tappijiet biex jevitaw kontaminazzjoni mill-arja (ara sezzjoni 1.8.1) dejjem jekk xi prodotti maġġuri ta' diżintegrazzjoni huma magħrufa li ma jevaporawx, u jekk tintuża' determinazzjoni tas-CO_2 indiretta (ara Anness 3).

Inkuba l-fliexken fit-temperatura magħżula (ara sezzjoni 1.8.8.1). Neħħi l-kampjuni għall-analiżi kimika jew il-kejl ^{14}C fil-bidu tat-test (jiġifieri qabel ma tibda d-diżintegrazzjoni; ara sezzjoni 1.7.1) u mbagħad f'intervalli tal-ħin addattati matul it-test. It-teħid tal-kampjuni jista' jsir billi jitneħħew is-sotto kampjuni (eż. 5 ml tal-kampjuni) minn kull repetizzjoni tal-esperiment jew permezz tal-esperjenza tal-konsegwenzi tal-fliexken kollha meta jittieħdu l-kampjuni. Il-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test tista' tinstab direttament jew indirettament (ara Anness 3). Normalment, ikun meħtieġ minimu ta' ħames postijiet fejn jittieħdu kampjuni waqt il-fażi tad-diżintegrazzjoni (jiġifieri wara li tintemm il-fażi tad-dewmien) sabiex tkun stmata r-rata kostanti affidabbli, sakemm ma jkunx ġustifikat li tliet postijiet tat-teħid ta' kampjuni huma biżżejjed għas-sustanzi li jiddiżintegraw malajr. Għas-sustanzi li ma jiddiżintegrawx malajr jista' jsir faċilment aktar kejl waqt il-fażi tad-diżintegrazzjoni u, għalhekk, għandhom jintużaw aktar postijiet tad-data biex tkun stmata k. L-ebda skeda tal-ħin fissa għat-teħid ta' kampjuni ma tista' tkun stipulata, għaliex ir-rata ta' bijodegradabbiltà tvarja; madankollu hu rakkomandat li jittieħed kampjun darba f'ġimgħa jekk id-diżintegrazzjoni tkun baxxa. Jekk is-sustanza tat-test tiddiżintegra malajr, it-teħid ta' kampjuni għandu jsir darba kuljum fl-ewwel tlett ijiem u mbagħad kull tieni jew tielet ġurnata. Taħt ċerti ċirkostanzi, bħal b'sustanzi li jkollhom azzjoni kimika mgħaġġla ħafna fl-ilma, ikun meħtieġ li jittieħdu kampjuni f'intervalli ta' siegħa. Hu rrikmandat li jsir studju preliminari qabel it-test sabiex ikunu magħrufa l-intervalli addattati tat-teħid ta' kampjuni. Jekk il-kampjuni jridu jkunu disponibbli għal aktar analiżi speċifika, ta' min jieħu aktar kampjuni u mbagħad jintgħażlu dawk li jridu jiġu analizzati fl-aħħar tal-esperiment wara li tintuża strateġija b'lura, jiġifieri l-aħħar kampjuni jiġu analizzati l-ewwel (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5 għal gwida dwar l-istabbilità tal-kampjuni waqt il-ħżin).

▼M1

1.8.9.2. *Numru ta' fliexken u kampjuni*

Lesti numru biżżejjed ta' fliexken tat-test biex ikollok:

— fliexken tat-test; tal-inqas fliexken doppji għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (preferibbilment minimu ta' 3) jew diversi fliexken tat-test għal kull konċentrazzjoni, jekk fliexken tat-test sħaħ jiġu pproċessati kull darba li jittieħdu l-kampjuni (simbolizzata F_T),

— fliexken tat-test għall-kalkolazzjoni tal-bilanċ tal-piż; tal-inqas fliexken doppji għal kull konċentrazzjoni tat-test (simbolizzata F_M),

— kontroll vojt, l-ebda sustanza tat-test; tal-inqas tal-flixkun tat-test vojt li fih biss l-ilma tat-test (simbolizzata F_B),

— kontroll ta' referenza; flixkien doppji bis-sustanza ta' referenza (eż. *aniline* jew *sodium benzoate* f'10 μg/l) (simbolizzata F_C). L-iskop tal-kontroll tar-referenza hu li jiġi kkonfermat minimu ta' attività tal-mikroorganiżmi. Jekk hu konvenjenti, sustanza ta' referenza mmarkata bir-raġġi tista' tintuża, anki meta d-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test tiġi mmonitorjata permezz ta' analiżi kimika,

— kontroll li ma fihx mikroorganiżmi; wieħed jew aktar mill-fliexken li fihom ilma tat-test mingħajr mikroorganiżmi biex tkun eżaminata d-diżintegrazzjoni mhux ħajja li jista' jkun hemm jew xi tneħħija oħra li mhix bijoloġika tas-sustanza tat-test (simbolizzata F_S). L-attività bijoloġika tista' titwaqqaf permezz ta' sterilizzazzjoni bi pressjoni għolja taħt stim (121 °C; 20 min) tal-ilma tat-test jew billi jiġi miżjud tossikant (eż. *sodium azide* (NaN_3) f'10-20 g/l, *chloride* tal-merkurju ($HgCl_2$) f'100 mg/l jew *formalin* f'100 mg/l jew billi tiġi esposta għar-raġġi gamma. Jekk jintuża $HgCl_2$, għandhom jiddisponu minnu bħala skart tossiku. Għall-ilma miżjud bin-naqal f'ammont kbir, mhux faċli li jinkisbu l-kundizzjonijiet li ma jkunx fihom mikroorganiżmi; f'dan il-każ hu irrikkmandat li ssir aktar minn sterilizzazzjoni waħda bi pressjoni għolja tal-istim (eż. tliet darbiet). Ta' min iqis li l-karatteristiċi tas-*sorption* tan-naqal jistgħu jinbidlu meta ssir l-isterilizzazzjoni bi pressjoni għolja tal-istim,

— kontrolli tal-aġenti li jħollu, li fihom l-ilma tat-test u l-ilma tat-test bis-sustanza ta' referenza; fliexken doppji trattati bl-istess ammont ta' aġent li jinħall u bl-użu tal-istess proċedura bħal dik użata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. L-iskop hu li jiġu eżaminati xi effetti ħżiena tal-aġent li jinħall billi tkun magħrufa d-diżintegrazzjoni tas-sustanza ta' referenza.

Fit-tfassil tat-test, l-investigatur għandu jqis l-importanza relattiva ta' żjieda fir-repetizzjoni tal-esperiment kontra żjieda fin-numru ta' ħinijiet tat-teħid tal-kampjuni. In-numru eżatt ta' fliexken meħtieġa jiddependi mill-metodu użat biex titkejjel id-diżintegrazzjoni (ara t-tielet paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1.; sezzjoni 1.8.9.4 u Anness 3).

▼**M1**

Għandhom jittieħdu żewġ sotto kampjuni (eż. 5 ml kampjuni) minn kull flixkun tat-test kull meta jittieħdu l-kampjuni. Jekk jintużaw diversi fliexken biex ikunu jistgħu jiġu pproċessati fliexken sħaħ, minimu ta' żewġ fliexken għandu jkun issagrifikat kull meta jittieħdu l-kampjuni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Preparazzjoni tal-fliexken għat-test tan-naqal sospiż [mhux obbligatorju]*

Żid il-volumi meħtieġa ta' ilma tat-test u n-naqal, jekk hemm bżonn, fil-kontenituri tat-test (ara sezzjoni 1.8.5). Il-preparazzjoni tal-fliexken għat-test tan-naqal sospiż huwa l-istess bħal dak għat-test li jsir fil-baħar miftuħ (ara s-sezzjonijiet 1.8.9.1 u 1.8.9.2). Jekk jista' jkun uża' fliexken tas-*serum* jew fliexken ta' għamla simili. Qiegħed il-fliexken magħluqa mimduda fuq dak li jregħedhom. Ovvjament, fliexken miftuħa għal sustanzi li ma jevaporawx ta' ^{14}C mhux mogħtija isem, għandhom jitqegħdu fil-pożizzjoni wieqfa, f'dan il-każ hu rrikkmandat li jsir tħawwid manjetiku u l-użu ta' *bars* manjetiċi miksija bil-ħġieġ. Jekk hemm bżonn, iċċarġja l-fliexken bil-gass biex iżżomm il-kundizzjonijiet xierqa li jkunu jeħtieġu l-ossiġnu.

1.8.9.4. *Determinazzjonijiet radjokemikali*

Is$^{-14}CO_2$ evolut jitkejjel indirettament u direttament (ara Anness 3). Is$^{-14}CO_2$ jiġi magħruf indirettament permezz tad-differenza bejn l-attività ^{14}C inizjali fl-ilma tat-test jew is-sospensjoni u l-attività totali tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni meta jittieħdu l-kampjuni kif jitkejlu wara li l-kampjun ikun mimli bl-aċtu għal ph 2-3 u jitneħħa s-CO_2. Il-karbonju inorganiku għalhekk jitneħħa u l-attività mkejla tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni tiġi minn materjal organiku. L-għarfien indirett tas$^{-14}CO_2$ m'għandux jintuża', jekk il-prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri li jevaporaw malajr jiffurmaw waqt it-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test (ara Anness 3). Jekk jista' jkun, l-evoluzzjoni $^{14}CO_2$ għandha titkejjel direttament (ara Anness 3) kull meta jittieħdu l-kampjuni f'tal-inqas flixkun wieħed tat-test, din il-proċedura tagħti lok biex ikunu ċċekkjati l-bilanċ tal-piż u l-proċess tal-bijodegradazzjoni, iżda hi ristretta għat-testijiet li jsiru fuq il-fliexken magħluqa.

Jekk is$^{-14}CO_2$ evolut jitkejjel direttament waqt it-test, aktar fliexken għandhom jiġu ppreparati għal dan il-għan fil-bidu tat-test. Hu rrikkmandat li tkun magħrufa b'mod dirett is$^{-14}CO_2$, jekk prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri li jevaporaw malajr jiġu ffurmati waqt it-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test. F'kull post ta' kejl il-fliexken tat-test l-oħra jimtlew bl-aċtu għal pH2-3 u s$^{-14}CO_2$ jinġabar f'as-sorbitur intern jew estern (ara Anness 3).

Hemm ukoll l-għażla fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test imsemmiija ^{14}C u prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri jistgħu jkunu magħrufa permezz tar-radjokromatografija (eż. kromatografija ta' saff irqiq, *RAD-TLC*) jew HPLC li taqbad ir-radjokimiċi.

Għażla oħra tista' tkun il-fażi tat-tqassim tar-radjoattività li fadal (ara Anness 1) u s-sustanza tat-test li jifdal wara l-evaporazzjoni u l-prodotti tat-trasformazzjoni jistgħu jiġu ddeterminati.

▼M1

Fl-aħħar tat-test il-bilanċ tal-piż għandu jkun determinat permezz ta' kejl dirett tas $^{-14}CO_2$ bl-użu ta' fliexken separati tat-test li minnhom ma jittieħdu l-ebda kampjuni waqt it-test (ara Anness 3).

1.8.9.5. *Analiżi kimika speċifika*

Jekk ikun hemm metodu analitiku sensittiv speċifiku, il-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi evalwata billi titkejjel il-konċentrazzjoni totali li jkun fadal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test minflok l-użu ta' tekniki li jimmarkaw bir-raġġi. Jekk tintuża' sustanza tat-test immarkata bir-raġġi (biex titkejjel il-mineralizzazzjoni totali), analiżi kimiċi speċifiċi jistgħu jsiru fl-istess ħin biex jagħtu informazzjoni oħra utli u biex jiċċekkjaw il-proċedura. Analiżi kimika speċifika tista' tintuża wkoll biex jitkejjlu l-prodotti ta' trasformazzjoni ffurmati waqt id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test, u dan hu rrikkmandat għas-sustanzi li huma mineralizzati b'nofs ħajjiet li jeċċedu 60 ġurnata. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni kull meta jittieħdu l-kampjuni għandhom jiġu mkejla u jsir rapport dwarhom (bħala konċentrazzjoni u bħala persentaġġ ta' dik applikata). Ġeneralment, il-prodotti tat-trasformazzjoni li jinstabu f'≥ 10 % tal-konċentrazzjoni applikata fi kwalunkwe ħin meta jittieħdu l-kampjuni għandhom ikunu identifikati sakemm ma jkunux hemm raġunijiet oħra ġustifikati biex isir mod ieħor. Il-prodotti ta' trasformazzjoni li għalihom dejjem qed jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet waqt l-istudju għandhom ukoll jitqiesu fl-identifikazzjoni, anki jekk il-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jeċċedux il-limitu msemmi hawn fuq, għaliex dawn jistgħu jindikaw persistenza. L-analiżi tal-prodotti ta' trasformazzjoni fil-kontrolli ta' sterilizzazzjoni għandha titqies, jekk trasformazzjoni mhux ħajja mgħaġġla tas-sustanza tat-test (eż. idrolisi) tista' tiġri. Il-bżonn ta' kwantifikazzjoni u identifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni għandhom jitqiesu każ b'każ, u jingħataw ġustifikazzjonijiet għalihom fir-rapport. Tekniki biex jiġu estratti permezz tal-aġent organiku li jinħall għandhom ikunu applikati skont id-direzzjonijiet mogħtija fil-proċedura analitika rispettiva.

Il-kampjuni kollha għandhom jinħażnu f'temperatura ta' 2 sa 4 °C u jiġu ssiġġillati biex ma tidħolx arja jekk l-analiżi ssir fi żmien 24 siegħa (jekk hu possibbli). Għal ħżin aktar fit-tul, il-kampjuni għandhom ikunu ffriżati taħt temperatura ta' – 18 °C jew ippriservati kimikament. L-użu ta' l-aċtu biex jiġu ppriservati l-kampjuni mhux metodu rrikmandat, għaliex il-kampjuni bl-aċtu jistgħu jkunu instabbli. Jekk il-kampjuni ma jiġux analizzati fi żmien 24 siegħa u mhumiex soġġetti għall-ħżin aktar fit-tul, għandu jsir studju dwar l-istabbilità tal-ħżin biex juru l-istabbiltà tal-kimiċi li hemm interess fihom taħt temperatura tal-ħżin ta' – 18 °C jew kundizzjonijiet ippriservati. Jekk il-metodu analitiku jinvolvi jew li jiġi estratt l-aġent li jinħall jew il-faži li jiġi estratt is-solidu (*SPE*), l-estrazzjoni għandha ssir mall-ewwel wara li jittieħdu l-kampjuni jew wara li jinħażen il-kampjun miżmum fil-friġġ għal massimu ta' 24 siegħa.

Skont is-sensittività tal-metodu analitiku, jista' jkun hemm bżonn volum ta' kampjuni akbar minn dawk indikati fil-paragrafu 1.8.1. It-test jista' jsir faċilment bil-volumi tat-test ta' litru fi fliexken b'volum ta' 2-3 litri, li bis-saħħa t'hekk ikunu jistgħu jinġabru kampjuni ta' madwar 100 ml.

▼M1

2. **DATA U RAPPURTAR**

2.1. KIF JIĠU TRATTATI R-RIŻULTATI

2.1.1. **Il-Plot tad-data**

Qarreb il-ħinijiet tat-teħid ta' kampjuni għal numru sħiħ ta' sigħat (sakemm is-sustanza ma tiddiżintegrax ħafna fi ftit minuti jew sigħat) iżda mhux għal numru sħiħ ta' ġranet. Ipplottja l-estimi tal-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test (għas-sustanzi msemmija ^{14}C) jew il-konċentrazzjoni li jkun fadal wara l-evaporazzjoni (għal sustanzi li mhux mogħtija isem), kontra l-ħin kemm fi plot lineari kif ukoll semi-logaritmiku (ara Figuri 1a, 1b). Jekk saret id-diżintegrazzjoni, qabbel ir-riżultati mill-fliexken F_T ma' dawk mill-fliexken F_S. Jekk il-medji tar-riżultati mill-fliexken bis-sustanza tat-test (F_T) u l-fliexken li ma fihomx mikro-organiżmi (F_S) jvarjaw b'inqas minn 10 %, wieħed jista' jassumi li d-diżintegrazzjoni osservata hi l-aktar waħda mhux ħajja. Jekk id-diżintegrazzjoni fil-fliexken F_S hi ibaxx, il-figuri jistgħu jintużaw biex isewwu dawk miksuba bil-fliexken F_T (billi jitnaqqsu minnhom) sabiex ikun stmat il-livell ta' bijodegradazzjoni. Meta jsiru analiżi mhux obbligatorji għall-prodotti maġġuri ta' trasformazzjoni, għandhom jingħataw plots tal-formazzjoni u l-waqgħa tagħhom flimkien ma' plot tal-waqgħa tas-sustanza tat-test.

Ħu stima tat-tul tal-fażi tad-dewmien t_L mill-kurva tad-diżintegrazzjoni (plot semi-logaritmiku) billi tislet il-parti lineari tad-diżintegrazzjoni żero jew inkella billi tiddetermina l-ħin għal madwar 10 % diżintegrazzjoni (ara Figuri 1a u 1b). Mill-plot semi-logaritmiku, ħu stima tar-rata tal-ewwel ordni kostanti, k, u l-iżball standard tagħha permezz ta' rigress linear ta' ln (attività ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni jew il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test) kontra l-ħin. Bil-kejl ^{14}C b'mod partikolari, uża biss data li tappartjeni għall-parti lineari tal-bidu tal-kurva wara li tkun intemmet il-fażi tad-dewmien, u agħti preferenza biex tagħżel ftit data u li tkun rappreżentattiva aktar milli tagħżel numru akbar ta' data aktar inċerta. L-inċertezza hawnhekk tinkludi żbalji interni fl-użu dirett irrikmandat tal-attivitajiet ^{14}C imkejla li jifdal wara l-evaporazzjoni (ara hawn taħt). Xi kultant ikun relevanti li tikkalkula żewġ rati kostanti differenti, jekk id-diżintegrazzjoni ssegwi mudell f'żewġ fażijiet. Għal dan il-għan huma mfissra żewġ fażijiet differenti tal-kurva tad-diżintegrazzjoni. Il-kalkolazzjonijiet tar-rata kostanti k, u n-nofs ħajja $t_{½}$ = ln2/k, għandhom isiru għal kull wieħed mill-fliexken individwali repetuti tal-esperiment, meta jittieħdu sotto kampjuni mill-istess flixkun, jew billi jintużaw il-valuri medja, meta l-fliexken kollha huma ipproċessati kull meta jittieħdu l-kampjuni (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.2). Meta tintuża l-proċedura msemmija l-ewwel, ir-rata kostanti u n-nofs ħajja għandhom ikunu rrappurtati għal kull wieħed mill-fliexken individwali repetuti tal-esperiment u bħala valur medju bl-iżball standard. Jekk intużaw konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, il-kurva tad-diżintegrazzjoni tista' tiddevja sew minn linja dritta (plot semi-logaritmiku) u l-movimenti tal-ewwel ordni jistgħu ma jkunux validi. Għalhekk ma jagħmilx sens li tiġi spjegata nofs ħajja. Madankollu, għal firxa limitata ta' data, movimenti tal-ewwel ordni li jixxiebhu jistgħu jiġu applikati u tkun stmata d-diżintegrazzjoni ta' nofs il-ħin DT_{50} (ħin biex tintlaħaq 50 % diżintegrazzjoni). Madankolli, ta' min iżomm f'moħħu, li t-tul ta' ħin tad-diżintegrazzjoni lil hinn mill-firxa ta' data magħżula ma jistax ikun previst bl-użu ta' DT_{50} li hu sempliċement dak li jiddeskrivi sett ta' data partikolari. Jeżistu għodda analitiċi li jiffaċilitaw il-kalkolazzjonijiet statistiċi u t-tpinġija tal-kurva u l-użu ta' dan it-tip ta' *software* hu irrikmandat.

▼M1

Jekk isiru analiżi kimiċi speċifiċi, ħu stima tar-rata tal-kostanti u tan-nofs ħajjiet għad-diżintegrazzjoni primarja bħal t'hawn fuq għal mineralizzazzjoni totali. Jekk id-diżintegrazzjoni primarja hi l-proċess li jillimita jistgħu xi kultant jintużaw punti tad-data mill-proċess kollu tad-diżintegrazzjoni. Dan jiġri minħabba li l-kejl huwa dirett b'kuntrast mal-kejl tal-attività ^{14}C.

Jekk jintużaw sustanzi msemmija ^{14}C, bilanċ tal-piż għandu jkun imfisser f'persentaġġ tal-konċentrazzjoni applikata tal-bidu, tal-inqas fl-aħħar tat-test.

2.1.2. **Attività li jifdal wara l-evaporazzjoni**

Meta l-parti msemmija ^{14}C ta' sustanza organika tkun bijodegradata, il-parti l-kbira tal–^{14}C tkun maqluba f'$^{14}CO_2$, filwaqt li parti oħra tintuża' għat-tkabbir tal-piż kollu tal-organiżmi u/jew sintesi ta' sustanzi extra-ċellulari meħtieġa għall-metaboliżmu. Għalhekk, il-bijodegradazzjoni' finali' kompluta ta' sustanza ma twassalx biex jiġi ikkonvertit 100 % tal-karbonju tagħha f'$^{14}CO_2$. Il–^{14}C li hemm fil-prodotti ffurmati bil-bijosinteżi hi sussegwentement merħija bil-mod bħala $^{14}CO_2$ minħabba "l-mineralizzazzjoni sekondarja". Għal dawn ir-raġunijiet il-plots tal-attività organika ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni (mkejla wara li jitneħħa s-CO_2) jew tas- $^{14}CO_2$ prodott kontra l-ħin juru "parti inferjuri" wara li tkun tlestiet id-diżintegrazzjoni. Dan jikkumplika l-interpretazzjoni kinetika tad-data u għal dan il-għan, il-parti inizjali tal-kurva biss (wara li tkun intemmet il-fażi tad-dewmien u qabel ma tkun intlaħqet madwar 50 % diżintegrazzjoni) għandha tintuża' normalment biex tkun stmata r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni. Jekk is-sustanza tat-test tiġi diżintegrata, l-attività totali organika ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni hi dejjem ogħla mill-attività ^{14}C assoċjata mas-sustanza tat-test intatta li jifdal. Jekk is-sustanza tat-test hi diżintegrata bir-reazzjoni ta' l-ewwel ordni u frazzjoni kostanti α hi mibdula fil-minerali CO_2, in-niżla inizjali tal–^{14}C kurva li tisparixxi (organika totali ^{14}C kontra l-ħin) se tkun α immultiplikata bin-niżla tal-kurva korrispondenti għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (jew, biex inkunu preċiżi, il-parti tas-sustanza tat-test mogħtija l-isem ^{14}C). Bl-użu tal-kejl tal-attività totali organika ^{14}C mhux ikkoreġuta, ir-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni ikkalkulata se tkun għalhekk konservattiva. Proċeduri biex ikunu stmati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mill-attivitajiet radjokimiċi mkejla bbażati fuq diversi ipotesi ta' simplifikazzjoni ġew deskritti fil-letteratura (2)(9)-(10)(11). Dawk il-proċeduri huma faċilment applikabbli għal sustanzi li jiddiżintegraw malajr.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Jekk jinstab li k hi indipendenti mill-konċentrazzjoni miżjuda (jiġifieri jekk il-k ikkalkulata hi kważi l-istess f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test), wieħed jista' jassumi li r-rata kostanti ta' l-ewwel ordni hi rappreżentattiva tal-kundizzjonijiet ta' l-ittestjar użati, jiġifieri s-sustanza tat-test, il-kampjun ta' l-ilma, u t-temperatura tat-test. Sa fejn jistgħu jiġu ġeneralizzati r-riżultati jew estiżi għal sistemi oħra jrid ikun evalwat billi jiġġudikahom espert. Jekk tintuża' konċentrazzjoni għolja tas-sustanza tat-test, u għalhekk id-diżintegrazzjoni ma ssegwix il-movimenti tal-ewwel ordni, id-data ma tistax tintuża' għal stima diretta tar-rata kostanti tal-ewwel ordni jew in-nofs ħajja korrispondenti. Madankollu, data meħuda minn test li juża' konċentrazzjoni għolja tas-sustanza tat-test tista' xorta tibqa' tajba biex ikun stmat l-ammont ta' mineralizzazzjoni totali u/jew biex ikunu misjuba u kwantifikati l-prodotti ta' trasformazzjoni.

▼M1

Jekk ikunu magħrufa r-rati ta' proċessi oħra ta' telf barra l-bijodegradazzjoni (eż. l-idroliżi jew l-evaporazzjoni mgħaġġla), huma jistgħu jitnaqqsu mir-rata ta' telf netta osservata waqt it-test biex tingħata stima approssimattiva tar-rata tal-bijodegradazzjoni. Id-data għall-idroliżi tista', eż. tinkiseb mill-kontroll li ma fihx mikro-organiżmi jew mill-ittestjar fl-istess ħin billi tintuża' konċentrazzjoni ogħla tas-sustanza tat-test.

L-għarfien indirett u dirett tas $^{-14}CO_2$ (sezzjoni 1.8.9.4 u Anness 3) jista' jintuża biss biex ikejjel sa fejn saret il-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test f'CO_2Ir-radjokromatografija (*RAD-TLC*) jew il-*HPLC* jistgħu jintużaw biex janalizzaw il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C u l-iffurmar ta' prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri (t-tielet paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.4). Biex tkun tista' ssir stima diretta tan-nofs ħajja, jeħtieġ li ma jkun hemm l-ebda prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri (mfissra bħala ≥ 10 % tal-ammont applikat tas-sustanza tat-testJekk ikun hemm prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri kif imfissra hawnhekk, jeħtieġ li jkun hemm evalwazzjoni dettaljata tad-dataDin tista' tinkludi testjar imtenni u/jew identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5) sakemm id-destin tal-prodotti ta' trasformazzjoni ma jistax ikun evalwat sew mill-esperjenza (eż. informazzjoni dwar ir-rotot tad-diżintegrazzjoni). Peress li l-proporzjon tal-karbonju tas-sustanza tat-test mibdul f'CO_2 ivarja (l-aktar skont il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u sottostrati oħra li jkun hemm, il-kundizzjonijiet tat-test u l-komunità tal-mikroorganiżmi), dan it-test ma jagħtix lok biex issir stima faċli tal-bijodegradazzjoni finali bħal f'test dgħajjef *DOC*; iżda r-riżultat huwa simili għal dak miksub permezz ta' test respirometriku. L-ammont ta' mineralizzazzjoni għalhekk ikun inqas minn jew ugwali għal-livell minimu ta' bijodegradazzjoni finaliBiex tinkiseb stampa aktar sħiħa tal-bijodegradazzjoni finali (l-mineralizzazzjoni u l-inkorporazzjoni fil-piż ta' l-organiżmi), l-analiżi tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C għandha ssir fl-aħħar tat-test (ara l-Anness 1). Il^{-14}C fl-għadira tal-partikuli separati se tkun magħmula minn ^{14}C inkorporati fil-piż tal-mikroorganiżmi batteriċi u ^{14}C iffurmati b'lura f'partikuli organiċi.

2.3. VALIDITÀ TAT-TEST

Jekk is-sustanza ta' referenza mhix diżintegrata fl-intervall tal-ħin mistenni (għal *aniline* u *sodium benzoate*, normalment inqas minn ġimagħtejn), il-validità tat-test tkun suspettata u trid tkun ivverifikata aktar, jew inkella t-test għandu jiġi mtenni b'kampjun ġdid tal-ilma. F'*ring* test ISO tal-metodu fejn seba' laboratorji li jinsabu madwar l-Ewropa ipparteċipaw, il-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni addattati għall-*aniline* varjaw minn 0,3 għal 1.7 ġurnata^{-1} b'medja ta' 0,8 d^{-1} f' 20 ºC u żball standard ta' ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0.9 ġranet). Ħinijiet tipiċi tad-dewmien kienu 1 sa 7 ijiem. L-ilmijiet eżaminati ġew irrappurtati li kellhom piż totali tal-mikroorganiżmi batteriċi li jikkorrispondi għal 10^3 -10^4 *units* li jiffurmaw kolonja (*CFL*) kull ml. Ir-rati tad-diżintegrazzjoni fl-ilmijiet Ewropej tan-Nofs li huma rikki fin-nutrienti kienu akbar minn dawk fl-ilmijiet Nordiċi li huma relattivament neqsin min-nutrienti tal-pjanti, li jista' jkun dovut għall-istat differenti tan-nutrizzjoni jew qabel kienu esposti għal sustanzi kimiċi.

L-irkuprar totali (bilanċ tal-piż) fl-aħħar ta' l-esperiment għandu jkun bejn 90 % u 110 % għas-sustanzi immarkati bir-raġġi, filwaqt li l-irkuprar inizjali fil-bidu ta' l-esperiment għandu jkun bejn 70 % u 110 % għas-sustanzi li mhumiex imsemmija. Madankollu, il-firxiet indikati għandhom ikunu interpretati biss bħala miri u m'għandhomx jintużaw bħala kriterji biex jiġi aċċettat it-test.

▼M1

3. **RAPPORT TAT-TEST**

It-tip ta' studju, jiġifieri t-test f'baħar miftuħ jew it-test tan-naqal li jkun miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, għandu jkun dikjarat sew fir-rapport tat-test, li għandu jkun fih ukoll ta' l-inqas l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test u s-sustanza(i) ta' referenza:

— ismijiet komuni, ismijiet kimiċi (irrikmanda *IUPAC* u/jew ismijiet *CAS*), numri *CAS*, *formulas* strutturali) li jindikaw il-pożizzjoni ta' ^{14}C jekk tintuża' sustanza mmarkata bir-raġġi) u karatteristiċi relevanti fiżiko-kimiċi tat-test u s-sustanza ta' referenza (ara sezzjonijiet 1.5 u 1.6),

— ismijiet kimiċi, numri *CAS*, *formulas* strutturali (li jindikaw il-pożizzjoni ta' ^{14}C jekk tintuża sustanza immarkata bir-raġġi) u karatteristiċi fiżiko-kimiċi tas-sustanzi użati bħala standards għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni,

— il-purità (l-impuritajiet) tas-sustanzi tat-test u ta' referenza,

— il-purità radjokimika tal-attività kimika msemmija u speċifika (fejn jixraq).

Ilma tal-wiċċ:

L-informazzjoni minima li ġejja għall-kampjun tal-ilma meħud għandha tingħata:

— post u deskrizzjoni tas-sit fejn ittieħdu l-kampjuni inkluż, jekk jista' jkun, l-istorja tal-kontaminazzjoni,

— id-data u l-ħin tal-ġbir tal-kampjuni,

— in-nutrienti (N totali, l-ammonju, in-*nitrite*, in-*nitrate*, P totali, *orthophosphate* maħlul fl-ilma),

— il-fond tal-ġbir,

— id-dehra tal-kampjun (eż. il-kulur u kemm hu mdardar),

— id-*DOC* u t-*TOC*,

— il-*BOD*,

— it-temperatura u l-*pH* fl-istess post u ħin tal-ġbir,

— l-ossiġnu jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis (obbligatorju biss jekk il-kundizzjonijiet fejn jeħtieġu l-ossiġnu mhumiex ovvji),

— kemm fih melħ jew kemm jgħaddi minnu (fil-każ tal-ilma baħar u ilma ftit mielaħ),

— solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ (fil-każ ta' kampjun mdardar),

— jekk jista' jkun xi informazzjoni oħra relevanti dwar il-post fejn ittieħdu l-kampjunu fil-ħin meta ttieħdu (eż. data vera jew storika dwar ir-rata tat-tgelgil tax-xmajjar jew il-kurrenti tal-baħar, postijiet maġġuri li jbattlu 'l barra li huma viċin il-post u t-tip ta' tbattil, il-kundizzjonijiet tat-temp qabel il-ħin li fih ittieħdu l-kampjuni,

u l-informazzjoni mhux obbligatorja li ġejja:

— il-piż totali tal-mikroorganiżmi (eż. l-għadd dirett ta' l-*acridine orange* jew il-units li jiffurmaw kolonji),

▼**M1**

— karbonju inorganiku,

— konċentrazzjoni ta' *chlorophyll-a* bħala stima speċifika għall-piż totali tal-mikroorganiżmi ta' l-alka.

Barra minn hekk, l-informazzjoni li ġejja dwar in-naqal għandha tingħata jekk isir it-test dwar in-naqal miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ:

— kemm hu fil-fond in-naqal miġbur,

— id-dehra tan-naqal (bħal ikkulurita, imtajna, imnaqqla, jew imramla),

— il-konsistenza (eż. ramel aħrax, ramel fin, naqal u tafal),

— użin xott f'g/l tas-solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, il-konċentrazzjoni *TOC* jew it-telf fil-piż meta jinxtegħel bħala kejl tal-kontenut ta' materja organika,

— il-*pH*,

— l-ossiġnu jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis (obbligatorju biss jekk il-kundizzjonijiet fejn jeħtieġ l-ossiġnu mhumiex ovvji).

Kundizzjonijiet tat-test:

— dewmien bejn il-ġbir u l-użu fit-test tal-laboratorju, il-ħżin tal-kampjun u t-trattament minn qabel tal-kampjun, id-data ta' kif marru l-istudji,

— l-ammont ta' sustanza tat-test applikat, il-konċentrazzjoni tat-test u s-sustanza ta' referenza,

— il-metodu tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test inkluż kull użu ta' aġenti li jinħallu fl-ilma,

— il-volum tal-ilma tal-wiċċ użat u n-naqal (jekk intuża) u l-volum użat għall-kampjuni f'kull intervall għall-analiżi,

— deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata,

jekk m'għandhomx jinżammu kundizzjonijiet mudlama, informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet b' "dawl batut",

— informazzjoni dwar il-metodu(i) użat(i) biex ikunu stabbiliti l-kontrolli li ma fihomx mikroorganiżmi (eż. it-temperatura, il-ħin u n-numru ta' sterilizzazzjonijiet bi stim ta' pressjoni għolja),

— it-temperatura tal-inkubazzjoni,

— informazzjoni dwar tekniki analitiċi u l-metodu(i) użati għal kejl radjokemikali u għall-bilanċ tal-piż u l-kejl tal-fażi tat-tqassim (jekk sar),

— numru ta' repetizzjonijiet tal-esperiment.

Riżultati:

— persentaġġi ta' rkuprar (ara sezzjoni 1.7.1),

— kemm għandhom jiġu mtennija u kemm huma sensittivi l-metodi analitiċi użati inkluż il-limitu ta' sejbien (*LOD*) u l-limitu ta' kwantifikazzjoni (*LOQ*) (ara sezzjoni 1.7.2),

▼M1

— id-data kollha mkejla (inkluż il-punti tal-ħin tat-teħid tal-kampjuni) u l-valuri kkalkulati f'forma ta' tabelli u l-kurvi tad-diżintegrazzjoni; għal kull konċentrazzjoni tat-test u għal kull flixkun irrepetut għall-esperiment, irrapporta l-ko-effiċjent tal-korrelazzjoni lineari għan-niżla tal-plot logaritmiku, il-fażi tad-dewmien stmata u r-rata kostanti tal-ewwel ordni jew li tixxiebah (jekk jista' jkun), u d-diżintegrazzjoni nofs ħajja korrispondenti (jew il-perjodu nofs ħajja, t_{50}),

— irrapporta l-valuri relevanti bħala medji tar-riżultati osservati fir-repetizzjonijiet individwali tal-esperimenti, eż. it-tul tal-fazi tad-dewmien, ir-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni u d-diżintegrazzjoni nofs ħajja (jew t_{50}),

— qiegħed f'kategoriji s-sistema jew bħala mhux addattata jew addattata kif ġudikati mid-dehra tal-kurva tad-diżintegrazzjoni u mill-influwenza li jista' jkun hemm tal-konċentrazzjoni tat-test,

— ir-riżultati tal-verifika tal-bilanċ tal-piż finali u r-riżultati fuq il-kejl tal-fażi tat-tqassim (jekk hemm),

— il-frazzjoni ta' ^{14}C mineralizzat u, jekk jintużaw analiżi speċifiċi, il-livell finali tad-diżintegrazzjoni primarja,

— l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni tal-konċentrazzjoni *molar* u l-persentaġġ tal-prodotti applikati u maġġuri ta' trasformazzjoni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5), fejn jixraq,

— mogħdija proposta tat-trasformazzjoni, fejn jixraq,

— diskussjoni tar-riżultati.

4. **LETTERATURA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Il-kwalità tal-ilma — Evalwazzjoni tal-bijodegrabbiltà li teħtieġ l-ossiġnu tal-*compounds* organiċi b'konċentrazzjonijiet baxxi — Parti 1: Ħawwad il-flixkun tat-test tal-grupp li fih ilma tal-wiċċ jew ilma tal-wiċċ/naqal miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

3. Metodu tat-Testjar C. 23. Trasformazzjoni tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu fl-ilma u li ma jeħtiġux ossiġnu fil-ħamrija.

4. Metodu tat-Testjar C.24. Trasformazzjoni tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu u li ma jeħtiġux l-ossiġnu biex jikbru fin-naqal akwatiku.

5. *OECD* (1993). Linji ta' gwida biex ikunu Ittestjati l-Kimiċi. *OECD*, Pariġi.

6. ISO 8245 (1999). Kwalità tal-ilma — Linji ta' gwida dwar l-għarfien tal-karbonju organiku totali (*TOC*) u karbonju organiku maħlul fl-ilma (*DOC*).

7. ISO 10634 (1995). Il-kwalità tal-ilma — Gwida biex jiġu ippreparati u trattati *compounds* organiċi li ma jinħallux malajr fl-ilma għal evalwazzjoni sussegwenti tal-bijodegradabbiltà tagħhom f'mezz li fih l-ilma.

8. Abbozz tal-*OECD* (2000). Dokument ta' Gwida dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli. Pubblikazzjonijiet dwar is-Saħħa u s-Sigurtà Ambjentali. Sensiela fuq l-Ittestjar u l-Evalwazzjoni. Nru 22 (biex ikun ippubblikat fis-sajf 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. u Alexander, M. (1984). Mudelli għall-movimenti tal-mineralizzazzjoni bil-varjabbli tal-konċentrazzjoni tas-sottostrata u d-densità tal-popolazzjoni Mikrobijoloġija Ambjentali Applikata 47, 394-401.

10. Ingerslev, F. u N. Nyholm. (2000). Test dwar it-tħawwid ta' flixkun biex ikunu magħrufa r-rati tal-bijodegradazzjoni tal-kimiċi msejħa ^{14}C b'konċentrazzjonijiet baxxi fis-sistemi ta' l-ilma tal-wiċċ. Sigurtà Ambjentali Ekotossika 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Rapport tat-test tar-*ring*: Kwalità tal-Ilma — Evalwazzjoni tal-bijodegradabbiltà tal-organiżmi li jeħtieġu l-ossiġnu fil-wiċċ tal-ilma tal-*compounds* organiċi b'konċentrazzjonijiet baxxi parti 1 — rapport tat-test tar-*ring* 1998/1999. Ħawwad il-flixkun tal-grupp tat-test li fih l-ilma tal-wiċċ jew l-ilma tal-wiċċ/naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

▼M1

Anness 1

Fażi tat-tqassim tal-^{14}C

Sabiex tiċċekkja l-proċedura, il-kejl tas-soltu tal-attività ^{14}C organika totali li jifdal wara l-evaporazzjoni (*TOA*) għandha tkun miżjuda bil-kejl tal-bilanċ tal-piż li jinvolvi għarfien dirett tal-$^{14}C_2$ evoluta wara li tinqabad f'assorbitur (ara Anness 3). Fiha nnifsha, formazzjoni pożittiva $^{14}CO_2$ hi evidenza diretta tal-bijodegradazzjoni kuntrarjament għad-diżintegrazzjoni mhux ħajja, jew mekkaniżmi oħra ta' telf, bħall-evaporazzjoni mgħaġġla u s-*sorption*. Informazzjoni oħra utli li tikkaratterizza l-imġiba tal-bijodegradabbiltà tista' tinkiseb mill-kejl tat-tqassim tat-*TOA* bejn l-istat maħlul fl-ilma (attività organika ^{14}C maħlula fl-ilma, *DOA*) u l-istat tal-partikuli separati (attività organika ^{14}C tal-partikuli separati, *POA*) wara l-firda tal-partikuli separati permezz ta' filtrar tal-membrana jew ta' proċess b'magna ta' ċentrifuga. Il-*POA* hu magħmul mis-sustanza tat-test *sorbed* fuq il-piż totali tal-mikroorganiżmi u fuq partikuli oħra barra mill-karbonju tas-sustanza tat-test li ntużaw għas-sinteżi tal-materjal ġdid ċellulari u riżultat t'hekk inkorporti fil-frazzjoni tal-piż totali tal-partikuli separati tal-mikroorganiżmi. L-iffurmar ta' materjal organiku ^{14}C maħlul fl-ilma jista' jkun stmat bħala *DOA* fl-aħħar tal-bijodegradazzjoni (art għolja fuq id-diżintegrazzjoni kontra l-kurva tal-ħin).

Ħu stima tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni f'kampjuni magħżula bl-iffiltrar tal-kampjuni fuq 0,22 μm jew 0,45 μm jew filter tal-membrana ta' materjal li ma jżommx fil-wiċċ ammonti sinifikanti tas-sustanza tat-test (filters *polycarbonate* jistgħu jkunu addattati). Jekk is-*sorption* tas-sustanza tat-test fuq il-filter hi kbira wisq biex tkun injorata (biex tiġi iċċekjata qabel l-esperiment) jista' jintuża' proċess b'magna ta' ċentrifuga (2 000 g, 10 min) minflok l-iffiltrar.

Ipproċedi bil-likwidu ffiltrat jew is-solidu mifrud mil-likwidu kif deskritt fl-Anness 3 għal kampjuni mhux iffiltrati. Ħoll il-filters tal-membrana fi fluwidu florexxenti addattat u għodd bħas-soltu, normalment billi tuża' biss il-metodu tal-proporzjon tal-istandards esterni biex titnaqqas l-illuminazzjoni, jew uża kampjun li jitħallat ma' l-ossiġnu. Jekk intuża l-proċess b'magna ta' ċentrifuga, erġa' ssospendi l-ballun żgħir iffurmat minn frazzjoni ta' partikuli separati f'1-2 ml ta' ilma distillat u ttrasferrixxih għal kontenitur żgħir tal-mediċini li hu florexxenti. Aħsel sussegwentement darbtejn b'1ml ilma distillat u ittrasferixxi l-ilma tal-ħasil għall-kontenitur żgħir tal-mediċini. Jekk hemm bżonn, is-sospensjoni tista' ssir f'ġel li jgħodd il-florexxenza tal-likwidu.

▼M1

Anness 2

proċedura semi-kontinwa

Tista' tkun meħtieġa l-inkubazzjoni fit-tul għal diversi xhur sabiex tintlaħaq diżintegrazzjoni suffiċjenti tas-sustanzi li ma jobdux. It-tul tat-test m'għandux jaqbeż normalment is-60 ġurnata sakemm il-karatteristiċi tal-kampjun tal-ilma oriġinali ma jinżammux permezz ta' tiġdid tat-test ta' sospensjoni. Madankollu, il-perjodu tat-test jista' jkun estiż għal massimu ta' 90 jum mingħajr tiġdid tas-sospensjoni tat-test, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test bdiet fl-ewwel 60 ġurnata.

Waqt l-inkubazzjoni għal perjodi twal, id-diversità tal-komunità tal-mikroorganiżmi tista' titnaqqas minħabba mekkaniżmi diversi ta' telf u minħabba l-qerda possibbli tal-kampjun tal-ilma ta' nutrijenti essenzjali u sottostrati primarji tal-karbonju. Hu għalhekk irrikmandat li jintuża test semi-kontinwu biex tkun determinata biżżejjed ir-rata ta' diżintegrazzjoni tas-sustanzi li jiddiżintegraw bil-mod. It-test għandu jinbeda permezz ta' proċedura semi-kontinwa jekk, skont esperjenza mgħoddija, hu mistenni li jkun meħtieġ perjodu ta' inkubazzjoni ta' tliet xhur biex tinkiseb 20 % diżintegrazzjoni tas-sustanza. Inkella, it-test normali tal-grupp jista' jinbidel f'wieħed semi-kontinwu, jekk ma tkunx inkisbet diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test waqt madwar 60 ġurnata ta' testjar bl-użu tal-proċedura tal-grupp. Il-proċedura semi-kontinwa tista' titwaqqaf u t-test jitkompla bħala esperiment tal-grupp, meta tkun ġiet irrekordjata diżintegrazzjoni sostanzjali (eż. > 20 %).

Fit-test semi-kontinwu, kull ġimagħtejn, madwar terz tal-volum tat-test tas-sospensjoni jiġi mibdul b'ilma frisk miġbur bis-sustanza tat-test miżjuda mal-konċentrazzjoni tal-bidu. In-naqal jiġi miżjud bl-istess mod ma' l-ilma mibdul mal-konċentrazzjoni tal-bidu (bejn 0,01 u 1 g/l), jekk isir it-test sospiż tan-naqal mhux obbligatorju. Meta jsir it-test mas-solidi tan-naqal miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, hu importanti li s-sistema sospiża kollha tinżamm anki waqt li jitneħħa l-ilma, u l-ħin residenti jkun identiku għas-solidi u l-ilma, għax inkella x-xebħ maħsub ma' sistema uniformi akwatika bl-ebda fażijiet fissi tista' tintilef. Għal dawn ir-raġunijiet, konċentrazzjoni inizjali tan-naqal miżmum bejn il-qiegħ u l-wiċċ fil-medda t'isfel tal-intervall speċifikat hi preferuta, meta tintuża l-proċedura semi-kontinwa.

Iż-żieda preskritta tas-sustanza tat-test tfisser li l-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza tat-test ma tiġix maqbuża bit-tiġdid parzjali tat-test ta' sospensjoni u, għalhekk, l-addattament, li hu ta' spiss meqjus b'konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, ikun evitat. Peress li l-proċedura tikkonsisti minn dħul mill-ġdid tal-organiżmi u kumpens tan-nutrijenti meqruda u s-sottostrati primarji, id-diversità oriġinali tal-mikroorganiżmi terġa' tinġab għal li kienet, u t-tul tat-test jista' jkun estiż għal dejjem fil-prinċipju. Meta tintuża' l-istess proċedura semi-kontinwa, hu importanti li wieħed jinnota l-konċentrazzjoni li jifdal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tiġi korretta għall-ammonti tas-sustanza tat-test miżjuda u mneħħija f'kull proċedura ta' tiġdid. It-total u l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test maħlula fl-ilma tista' tintuża' b'mod alternat għall-*compounds* li jiffurmaw lura ftit. Il-formazzjoni lura hi insinifikanti (< 5 %) taħt il-kundizzjonijiet speċifikati (0,1-1g solidi/l) għas-sustanzi ta' *log Kow* < 3 (validi għall-*compounds* newtrali *lipophilic*). Dan jidher permezz tal-eżempju ta' kalkolazzjoni li ġej. 0,1 g/l ta' solidi bejn wieħed u ieħor jikkorrispondu għal 10 mg ta' karbonju kull litru (frazzjoni ta' karbonju, f_C = 0.01). Billi nassumu li;

Log K_{ow} (tas-sustanza tat-test) = 3

$K_{oc} = 0.42 \times K_{ow}$

Koeffiċjent ta' partizzjoni, $K_d = f_C \times K_{oc}$

imbagħad, il-frazzjoni maħlula fl-ilma tal-konċentrazzjoni totali (C-ilma (C_w)/C-totali (C_t) hija:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Anness 3

Kif jiġi determinat il-$^{14}CO_2$

Għarfien indirett tal-$^{14}CO_2$

Għall-kejl tas-soltu, il-metodu indirett huwa normalment l-inqas wieħed li jieħu ħin u l-aktar metodu preċiż jekk is-sustanza tat-test ma tevaporax malajr u ma tkunx trasformata f'prodotti tat-trasformazzjoni li jevaporaw malajr. Trasferiment sempliċi tal-kampjuni mhux iffiltrati eż. daqs ta' 5 ml f'kontenituri żgħar florexxenti użati għall-mediċina. Attività addattata fil-kampjuni hija5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq) fil-bidu, u attività minima inizjali hi madwar 1 000 dpm. Is-CO_2 għandu jitneħħa wara li jinkesa bl-aċtu għal pH 2-3 b'1-2 qatriet ta' H_3PO_4 ikkonċentrat jew *HC1*. It-tneħħija tas-CO_2 tista' ssir billi jiddaħħlu bżieżaq tal-arja għal nofs siegħa — siegħa. Inkella, il-kontenituri ż-żgħar użati għall-mediċina jistgħu jiġu mħawda bis-saħħa għal siegħa — sagħtejn (per eżempju fuq *microplate shaker*) jew b'tħawwid aktar ġentili li jitħalla bil-lejl. L-effiċjenza tal-proċedura tat-tneħħija tas-CO_2 għandha tkun iċċekkjata (billi jittawwal il-perjodu ta' l-iċċarġjar bil-gass jew tat-tħawwid). Likwidu florexxenti, addattat biex jiġu magħduda l-kampjuni akwatiċi għandu mbagħad jiġi miżjud, il-kampjuni uniformi fuq mikser li jdur u r-radjoattività magħrufa permezz tal-għadd tal-likwidu florexxenti, titnaqqas l-attività tal-isfond misjub fit-testijiet vojta (F_B). Sakemm l-ilma tat-test ma jkunx ikkulurit ħafna jew ikun fih konċentrazzjoni għolja tal-partikuli, il-kampjuni normalment juru florexxenza uniformi u se jkun biżżejjed biex jitnaqqsu l-korrezzjonijiet bl-użu ta' standard estern. Jekk l-ilma tat-test hu ikkulurit ħafna, jista' jkun hemm bżonn li titnaqqas il-korrezzjoni permezz ta' żjieda ta' standard intern. Jekk il-konċentrazzjoni tal-partikuli hi għolja jista' ma jkunx possibbli biex tinkiseb taħlita jew ġel uniformi, jew il-varjazzjoni fit-tnaqqis bejn il-kampjuni tista' tkun kbira. F'dak il-każ il-metodu tal-għadd deskritt hawn taħt għat-test tat-taħlitiet ta' semi-likwidi jista' jintuża. Jekk it-test isir bħala test tan-naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, il-kejl tal-$^{14}CO_2$ jista' jsir indirettament billi jittieħed kampjun uniformi ta' 10 ml tal-ilma tat-test/sospensjoni tat-test u jinfirdu l-fażijiet permezz ta' proċess b'magna ta' ċentrifuga b'veloċità addattata (eż. b'40 000 m/s^2 għal 15-il min.) Il-fażi akwatika għandha mbagħad tkun trattata kif deskritt hawn fuq. L-attività ^{14}C fil-fażi tal-partikuli separati (*POA*) għandha tkun determinata billi n-naqal jerġa' jiġi miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ f'volum żgħir ta' ilma distillat, billi jiġi trasferit f'kontenituri żgħar florexxenti użati għall-mediċina, u billi jiżdied il-likwidu florexxenti ħalli jifforma ġel (jeżistu likwidi speċjali florexxenti għal dan il-għan). Skont in-natura tal-partikuli (eż. kemm fihom materjal organiku), jista' jkun jaqbel li l-kampjun jiġi diġerit bil-lejl b'*solubiliser* tat-*tissue* u mbagħad jiġi uniformi fuq mikser li jdur qabel ma jiżdied il-likwidu florexxenti. Inkella, il-*POA* tista' tinstab permezz ta' kombustjoni mill-ossiġnu bl-użu ta' dak li jħallat ma' l-ossiġnu l-kampjun. Meta tkun qed tgħodd, l-istandards interni għandhom dejjem ikunu inklużi, u jista' jkun hemm bżonn li jsiru t-tiswijiet tat-tnaqqis billi jiżdied standard intern għal kull kampjun individwali.

Għarfien dirett tal-$^{14}CO_2$

Jekk il-$^{14}CO_2$ evoluta titkejjel direttament, għandha ssir billi jiġu preparati aktar fliexken fil-bidu tat-test, jiġu pproċessati l-fliexken tat-test f'kull punt tal-kejl billi l-fliexken tat-test jimtlew bl-aċtu għal pH 2-3 u jinġabar il-$^{14}CO_2$ f'assorbitur intern (imqiegħed f'kull flixkun fil-bidu tat-test) jew estern. Bħala mezz li jassorbi jista' jintuża' jew l-*alkali* (eż. taħlita *1 N NaOH*, jew *NaOH pellet*), *ethanolamine* jew ibbażata fuq l-*ethanolamine*. Għall-kejl dirett tal-$^{14}CO_2$, il-fliexken għandhom ikunu magħluqa per eżempju bl-għeluq tal-lastku sintetiku.

▼**M1**

Figura 1a

Eżempju ta' plot aritmetiku tad-data (l-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni kontra l-ħin

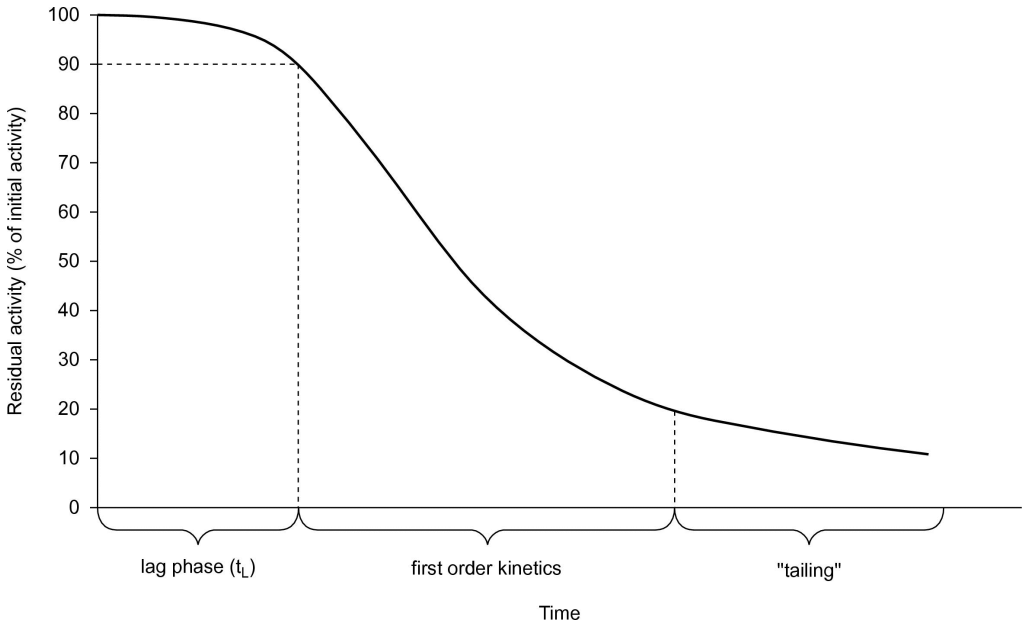
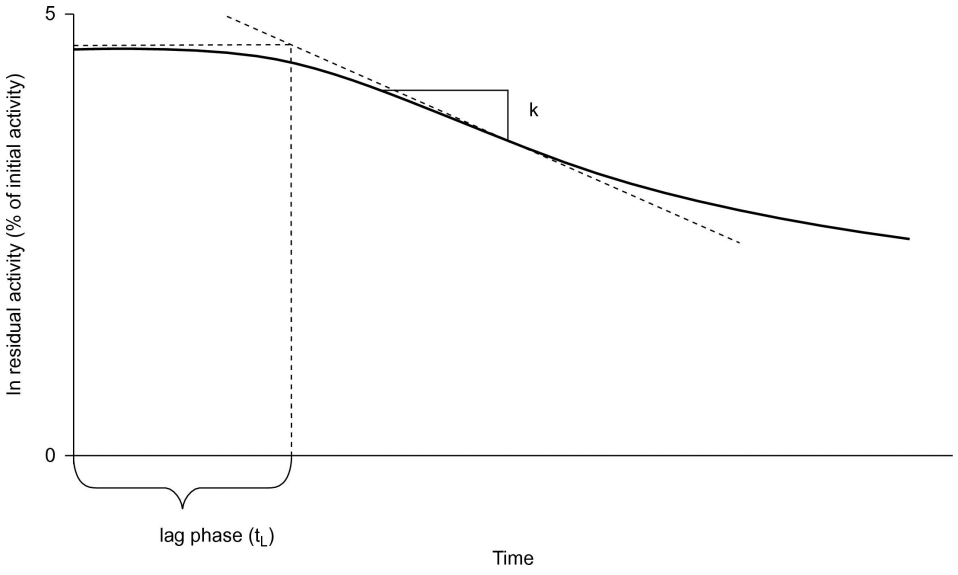


Figura 1b

Eżempju ta' plot semi-logaritmika (ln għall-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni kontra l-ħin).



▼M1

C.26. ***LEMNA* SP. TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 221 (2006) (1). Kien hemm qbil wiesa' bejn l-awtoritajiet tal-UE li t-test tal-*Lemna* huwa alternattiva xierqa għal test tal-algal għal sustanzi li għandhom kulur qawwi (2)(3).

1.1. DAĦLA

Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex tiġi evalwata t-tossiċità ta' sustanzi għall-pjanti akkwatiċi tal-ilma ħelu tal-ġeneru *Lemna* (ħażiż li jgħatti l-wiċċ tal-ilma qiegħed jew duckweed). Dan huwa bbażat fuq linji gwida eżistenti (4)(5)(6)(7)(8)(9) iżda jinkludi modifikazzjonijiet ta' dawk il-metodi sabiex jirrifletti r-riċerka u konsultazzjoni riċenti fuq għadd ta' kwistjonijiet importanti. Il-metodu propost ġie vvalidat permezz ta' ring-test internazzjonali (10).

Dan il-Metodu ta' ttestjar jiddeskrivi l-ittestjar għal tossiċità li juża *Lemna gibba* u *Lemna minor*, li t-tnejn li huma ġew studjati fit-tul u li huma s-suġġett tal-istandards imsemmija hawn fuq. It-tassonomija ta' *Lemna* spp. hija diffiċli, peress li hija kkumplikata bl-eżistenza ta' għażla wiesgħa ta' fenotipi. Għalkemm varjabilità ġentika bħala reazzjoni għal sustanzi tossiċi tista' tiġri fil-każ ta' *Lemna*, bħalissa mhemmx dejta suffiċjenti dwar dan is-sors ta' varjabilità li jissuġġerixxi klonu biex jintuża f'dan il-Metodu ta' ttestjar. Ta' min jinnota li dan it-test ma jsirx b'mod fejn jiġi evitat kull kuntatt ma' mikro-organiżmi oħra, iżda jittieħdu passi matul l-istadji tal-proċedura tat-test li jnaqqsu kemm jista' jkun il-kontaminazzjoni minn organiżmi oħra.

Dettalji dwar ittestjar b'tiġdid (semi-statiku u flow-through) u mingħajr tiġdid (statiku) tas-soluzjoni tat-test huma deskritti. Skont ma jkunu l-għanijiet tat-test u r-rekwiżiti regolatorji, huwa rrakkomandat li tiġi kkunsidrata l-applikazzjoni ta' metodi semi-statiċi u flow through, eż. għal sustanzi li malajr jintilfu minn soluzzjoni bħala riżultat ta' volatilizzazzjoni, fotodegradazzjoni, preċipitazzjoni jew bijodegradazzjoni. Iktar indikazzjonijiet huma mgħotija fi (11).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet li ġejjin huma użati għall-għanijiet tal-Metodu tal-Ittestjar:

Bijomassa: hija l-piż niexef ta' materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test, surrogati għal bijomassa, bħal ma huma għadd ta' frondi u erja ta' frondi, huma mkejla tipikament u l-użu tat-terminu "bijomassa" għalhekk jirreferi għal dawn il-kejlijiet ta' surrogati wkoll.

Klorożi: huwa l-fenomenu ta' meta jisfar it-tessut tal-frond.

Klonu: huwa organiżmu jew ċellula mnissla minn individwu wieħed permezz ta' riproduzzjoni asesswali. Individwi mill-istess klonu huma, għalhekk, ġenetikament identiċi.

Kolonja: tfisser il-kollettiv tal-frond omm u l-frond bint (normalment 2 sa 4) imwaħħlin ma' xulxin. Xi kultant issir referenza għaliha bħala pjanta.

▼M1

EC_x: hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test maħlula ġo midjum tat-test li jirriżulta minn x % (eż. 50 %) tnaqqis fit-tkabbir ta' *Lemna* f'perjodu stabbilit ta' espożizzjoni (li trid tkun imsemmija espleċitament jekk devjanti mid-dewmien sħiħ jew normali tat-test). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew rendiment, is-simbolu "E_rC" huwa użat għar-rata ta' tkabbir u "E_yC" huwa użat għar-rendiment, segwit mill-varjabbli ta' kejl użat, eż. (għadd ta' frond).

Flow-through: huwa test fejn is-soluzzjonijiet tat-test huma mibdula kontinwament.

Frond: hija struttura f'għamla ta' werqa individwali/waħda ta' pjanta duckweed. Hija l-iżgħar unità, i.e. individwali, kapaċi li tirriproduċi.

Gibbożità: tfisser frondi li jidhru mħattbin jew minfuħin.

Tkabbir: huwa żieda fil-varjabbli tal-kejl, eż. l-għadd tal-frondi, il-piż niexef, piż bil-likwidu jew l-erja tal-frond, tul il-perjodu tat-test.

Rata tat-tkabbir (rata medja ta' tkabbir speċifiku): hija ż-żieda logaritmika fil-bijomassa waqt il-perjodu ta' espożizzjoni.

Konċentrazzjoni Minima tal-Effett Osservat (LOEC): hija l-iktar konċentrazzjoni baxxa ttestjata li fiha jiġi osservat li s-sustanza għandha effett statistikament sinifikanti li jnaqqas it-tkabbir (b'valur $p < 0.05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'ħin speċifiku ta' espożizzjoni. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test b'valur ogħla mil-LOEC irid ikollhom effett daqs jew ikbar minn dawk osservati bil-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jistgħux jiġu ssodisfatti, għandha spjegazzjoni sħiħa tingħata għalfejn il-LOEC (u għalhekk l-NOEC) ġie magħżul.

Varjabbli ta' kejl: huma kull tip ta' varjabbli li huma mkejla, biex jiġi espress il-punt ta' tmiem tat-test, billi jintuża varjabbli ta' rispons wieħed jew iktar varjabbli differenti. F'dan il-metodu l-għadd tal-frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk u l-piż niexef huma varjabbli ta' kejl.

Monokultura: hija kultura bi speċi waħda ta' pjanta.

Nekrożi: hija tessut tal-frond mejjet (i.e. abjad jew imxarrab bl-ilma)

Konċentrazzjoni Bl-Ebda Effett Osservat (NOEC): hija l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt il-LOEC.

Fenotipa: hija l-karatteristiċi osservabbli ta' organiżmu determinati mill-interazzjoni tal-ġeni tagħha mal-ambjent tagħha.

Varjabbli ta' rispons: huma varjabbli li jintużaw għall-istima ta' tossiċità derivata minn varjabbli mkejla li jiddeskrivu l-bijomassa b'metodi differenti ta' kalkolu. Għal dan il-metodu, ir-rati ta' tkabbir u r-rendiment huma varjabbli ta' rispons derivati minn varjabbli ta' kejl bħall-għadd ta' frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk u l-piż niexef.

Test semi-statiku (ta' tiġdid): huwa test li fih s-soluzzjoni tat-test hija perjodikament mibdula f'intervalli speċifiċi matul it-test.

Test statiku: huwa metodu tat-test mingħajr it-tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

▼M1

Punt ta' tmiem tat-test: jiddeskrivi l-fattur ġenerali li jinbidel bis-sustanza kimika relattiva għall-kontroll bħala għan tat-test. F'dan il-metodu, il-punt ta' tmien tat-test huwa l-inibizzjoni tat-tkabbir, li jista' jiġi espress b'varjabbli differenti ta' rispons li huma bbażati fuq varjabbli waħda jew iktar ta' kejl.

Midjum tat-test: huwa l-midjum komplut ta' tkabbir sintetiku li fuqu jikbru l-pjanti tat-test meta esposti għas-sustanza tat-test. Is-sustanza tat-test tiġi normalment maħlula fil-midjum tat-test.

Rendiment: huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex jesprimi bijomassa fit-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu tal-espożizzjoni

1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST

Kulturi ta' pjanti li jikbru b'mod esponenzjali, tal-ġeneru *Lemna* jitħallew jikbru bħala monokulturi f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test fuq perjodu ta' sebat ijiem. L-għan tat-test huwa li tikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanza fuq it-tkabbir veġetattiv fuq dan il-perjodu, bbażat fuq valutazzjoni ta' varjabbli ta' kejl magħżula. L-għadd tal-frondi huwa l-varjabbli primarju tal-kejl. Mill-inqas varjabbli wieħed ieħor ta' kejl (l-erja totali tal-frond, piż niexef jew piż frisk) hu mkejjel ukoll, peress li xi sustanzi jistgħu jaffetwaw varjabbli oħra ta' kejl ħafna iktar minn numri tal-frond. Biex jiġu kkwantifikati l-effetti relatati mas-sustanza, it-tkabbir fis-soluzzjonijiet tat-test huwa mqabbel ma' dak tal-kontrolli u l-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala l-EC_x (eż EC_{50})

Il-punt ta' tmiem tat-test huwa l-inibizzjoni ta' tkabbir, espress bħala żieda logaritmika fil-varjabbli ta' kejl (rata speċifika ta' tkabbir medju) matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Mir-rati medji ta' tkabbir speċifiku rreġistrati f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala l-E_rC_x (eż. E_rC_{50}).

Varjabbli ta' rispons addizzjonali użat f'dan il-Metodu ta' ttestjar hu r-rendiment, li jista' jkun neċessarju biex jiġu rispettati r-rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'xi pajjiżi. Jiġi ddefinit bħala l-varjabbli ta' kejl fit-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni li minnhom jitnaqqsu l-varjabbli fit-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni. Mir-rendiment irreġistrat f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' rendiment (eż. 50 %) hija kkalkulata u espressa bħala E_yC_x (eż. E_yC_{50}).

Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni minima tal-effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bl-ebda effett osservat (NOEC) jistgħu jiġu ddeterminati statiskament.

1.4. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Metodu analitiku, b'sensittività xierqa għal kwantifikazzjoni tas-sustanza fil-midjum tat-test għandha tkun aċċessibbli.

▼M1

Informazzjoni fuq is-sustanza tat-test li tista' tkun utli biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula strutturali, purità, solubilità tal-ilma, stabbiltà fl-ilma u dawl, pK_a, K_{ow}, pressjoni tal-fwar u bijodegradabilità. Is-solubilità tal-ilma u l-pressjoni tal-fwar tista' tiġi użata biex jiġi kkalkulat il-kostanti tal-Prinċipju ta' Henry, li jindika jekk huwiex probabbli li jkun hemm telf sinifikanti matul il-perjodu tat-test. Dan juri jekk għandhomx jittieħdu passi sabiex dan it-telf jiġi kontrollat. Meta l-informazzjoni dwar is-solubilità u l-istabbiltà tas-sustanza tat-test m'hijiex ċerta, huwa rrakkomandat li dawn jiġu vvalutati taħt il-kundizzjonijiet tat-test, i.e. midjum ta' tkabbir, temperatura, sistema ta' dawl li għandha tintuża fit-test.

Meta l-kontroll tal-aċidità tal-midjum tat-test huwa partikolarment importanti, pereżempju. meta jiġu ttestjati metalli jew sustanzi li huma idrolitikament instabbli, iż-żieda ta' buffer lill-midjum ta' tkabbir huwa rrakkomandat (ara l-ewwel paragrafu fit-taqsima 1.7.4.). Iktar indikazzjonijiet għal ittestjar ta' sustanzi b'karatteristiċi fiżikokemikali li jagħmilhom diffiċli biex jiġu ttestjati huwa pprovdut fi (11).

1.5. SUSTANZA TA' REFERENZA

Sustanza/i ta' referenza, bħal 3,5-dichlorophenol użat fir-ring test internazzjonali (10), tista'/jistgħu tiġi/jiġu ttestjat(i) bħala mezz ta' kontroll tal-proċedura tat-test. Huwa opportun li tiġi ttestjata sustanza ta' referenza mill-inqas darbtejn f'sena jew, meta l-ittestjar isir inqas frekwentement, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità tas-sustanza tat-test.

1.6. VALIDITÀ TAT-TEST

Biex it-test ikun validu, il-ħin ta' irduppjar tal-għadd tal-frondi fil-kontroll irid ikun inqas minn jumejn u nofs (60 siegħa), li jikkorispondi ma' żieda ta' bejn wieħed u ieħor seba' darbiet f'sebat ijiem u rata medja ta' tkabbir speċifiku ta' 0.275 d^{-1}. Permezz tal-kundizzjonijiet tal-midja u t-test deskritti fil-Metodu tal-Ittestjar, dan il-kriterju jista' jintlaħaq bl-użu ta' sistema ta' ttestjar statiku (8). Huwa wkoll maħsub li dan il-kriterju jista' jiġi milħuq taħt kundizzjonijiet ta' ttestjar semi-statiku u flow-through. Kalkolu tal-ħin ta' irduppjar huwa muri fit-taqsima 2.1.

1.7. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.7.1. **Apparat**

Kull tagħmir f'kuntatt mal-midja tat-test għandu jkun magħmul minn ħġieġ jew materjal ieħor li ma jagħmilx reazzjoni kimika. Tagħmir tal-ħġieġ użat għal-għanijiet tal-kultura u ittestjar għandu jiġi mnaddaf minn kull kontaminant kimiku li jista' jipperkola fil-midjum tat-test u jrid ikun sterili. Il-konteniturі tat-test għandhom ikunu wiesgħa biżżejjed sabiex il-frondi ta' kolonji differenti fil-konteniturі tal-kontroll jikbru mingħajr ma jirkbu lil xulxin fit-tmiem tat-test. Ma jimpurtax jekk l-għeruq imissu l-qiegħan tal-konteniturі tat-test, iżda fond minimu ta' 20 mm u volum minimu ta' 100 ml f'kull kontenitur tat-test huwa rrakkomandat. L-għażla tal-konteniturі tat-test ma hijiex ta' importanza kbira sakemm dawk ir-rekwiżiti jiġu mħarsa. Ġarar tal-ħġieġ, plattini ta' kristalizzazzjoni u plattini petri tal-ħġieġ ta' daqsijiet adatti kollha rriżultaw xierqa. Kontenituri tal-ħġieġ għandhom ikunu mgħottija sabiex titnaqqas kemm jista' jkun l-evoparazzjoni u l-kontaminazzjoni bi żball, waqt li titħalla l-bidla tal-arja neċessarja. Kontenturi tat-test xierqa, u partikolarment l-għotien, għandhom jevitaw dellijiet jew bidliet fil-karatteristiċi spettrali tad-dawl.

▼M1

Il-kulturi u l-kontenituri tat-test ma għandhomx jinżammu flimkien. Dan l-aħjar li jsir permezz tal-użu ta' kmamar ambjentali ta' tkabbir, inkubaturi, jew kmamar separati. L-illuminazzjoni u t-temperatura għandhom ikunu jistgħu jiġu kkontrollati u miżmuma f'livell kostanti (ara t-taqsima 1.7.8).

1.7.2. **Organiżmu tat-test**

L-organiżmu użat għal dan it-test huwa jew *Lemna gibba* jew *Lemna minor*. Deskrizzjonijiet qosra ta' speċi ta' duckweed li ġew użati għal ittestjar għal tossiċità huma mogħtija fl-Appendiċi 1. Materjal ta' pjanti jista' jinkiseb minn kollezzjoni ta' kultura, laboratorju ieħor jew mill-għalqa. Jekk miġbura mill-għalqa, il-pjanti għandhom jiġu miżmuma fil-kultura fl-istess midjum bħal dak użat għall-ittestjar mill-inqas għal tmien ġimgħat qabel l-użu. Siti ta' għelieqi użati għal ġabra ta' kulturi inizjali għandhom ikunu ħielsa minn sorsi ovvji ta' kontaminazzjoni. Jekk miġjuba minn laboratorju ieħor jew minn kollezzjoni ta' kultura għandhom jiġu miżmuma bl-istess mod mill-inqas għal tliet ġimgħat. Is-sors tal-materjal tal-pjanti jew tal-ispeċi jew klonu (jekk magħruf) użat għall-ittestjar għandu dejjem jiġi rrapurtat.

Monokulturi, li huma viżibilment ħielsa minn kontaminazzjoni minn organiżmi oħrajn bħal alga u protożoa, għandhom jiġu użati. Pjanti b'saħħithom ta' *L. minor* jikkonsistu f'kolonji li jkollhom bejn żewġ jew ħames frondi, waqt li kolonji b'saħħithom ta' *L. gibba* jista' jkollhom sa seba' frondi.

Il-kwalità u l-uniformità tal-pjanti użati għat-test ikollhom influwenza sinifikanti fuq ir-riżultat tat-test u għalhekk għandhom jintgħażlu bil-ħsieb. Pjanti żgħar li jikbru malajr mingħajr leżjonijiet li jidhru jew diskolorazzjoni (kloroża) għandhom jiġu użati. Kulturi ta' kwalità tajba huma indikati b'inċidenza għolja ta' kolonji li fihom mill-inqas żewġ frondi. Għadd kbir ta' frondi waħedhom juri stress ambjentali, eż. limitazzjoni ta' nutrijenti, u materjal ta' pjanti minn kulturi bħal dawn ma għandux jintuża għal ittestjar.

1.7.3. **Kultura**

Biex tnaqqas il-frekwenza ta' manteniment ta' kulturi (eż. meta l-ebda *Lemna* test ma jkun ippjanat għal xi perjodu), il-kulturi jistgħu jinżammu f'illuminazzjoni u temperatura (4-10 °C) mnaqqsa. Dettalji ta' produzzjoni ta' kulturi huma mogħtija fl-Appendiċi 2. Sinjali ovvji ta' kontaminazzjoni b'alga jew organiżmi oħrajn jirrikjedu sterilizzazzjoni tal-wiċċ ta' sub-kampjun ta' frondi *Lemna*, segwit bi trasferiment f'midjum ġdid (ara l-Appendiċi 2). F'dan il-każ, il-kultura kkontaminata li jibqa' għandha tintrema.

Mill-inqas sebat ijiem qabel l-ittestjar, kolonji suffiċjenti huma trasferiti asettikament f'midjum sterili ġdid u kkultivati għal 7-10 ijiem taħt il-kundizzjonijiet tat-test.

1.7.4. **Midjum tat-test**

Midja differenti huma rrakkomandati għal *Lemna minor* u *Lemna gibba*, kif deskritt hawn taħt. L-inklużjoni ta' buffer pH fil-midjum tat-test (MOPS (aċidu sulfoniku 4-morpholinepropane, CAS No: 1132-61-2; EINECS No: 214-478-5 f'midjum *L. minor* u $NaHCO_3$ f'midjum *L. gibba*) għandha tiġi kkunsidrata akkuratament meta huwa suspettat li jista' jagħmel reazzjoni mas-sustanza tat-test u jinfluwenza l-espressjoni tat-tossiċità tiegħu. Midjum Steinberg (12) huwa aċċettabbli wkoll sakemm jintlaħqu l-kriterji tal-validità.

▼M1

Modifkazzjoni tal-istandard Svediż (SIS) midjum ta' tkabbir *Lemna* huwa rrakkomandat għal produzzjoni ta' kulturi ta' *L. minor* u ttestjar tal-istess. Il-kompożizzjoni ta' dan il-midjum hija mogħtija fl-Appendiċi 3.

Il-midjum ta' tkabbir, 20X — AAP, kif deskritt fl-Appendiċi 3, huwa irrakkomandat għal produzzjoni ta' kulturi u ttestjar ta' *L. gibba*.

Il-midjum Steinberg, kif deskritt fl-Appendiċi 3, huwa wkoll adattat għal *L. minor*, iżda jista' jintuża għal *L. gibba* sakemm il-kriterji tal-validità jintlaħqu.

1.7.5. **Soluzzjonijiet tat-test**

Soluzzjonijiet tat-test huma ġeneralment ippreparati bid-diluzzjoni ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata. Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata tas-sustanza tat-test huma ġeneralment ippreparati billi tinħall is-sustanza fil-midjum tal-tkabbir.

L-iktar konċentrazzjoni għolja ttestjata tas-sustanza tat-test normalment ma għandiex teċċedi s-solubilità tal-ilma tas-sustanza taħt il-kundizzjonijiet tat-test. Għandu jiġi kkunsidrat iżda li *Lemna* spp. iżżomm fil-wiċċ u tista' tiġi esposta għal sustanzi li jinġabru bejn l-ilma u l-arja (eż. sustanzi li ma tantx jinħallu fl-ilma jew sustanzi idrofobiċi jew sustanzi attivi fil-wiċċ). F'ċirkustanzi bħal dawn, l-espożizzjoni tirriżulta minn materjal li ma huwiex fis-soluzzjoni u l-konċentrazzjonijiet tat-test, jistgħu, skont il-karatteristiċi tas-sustanza tat-test, jeċċedu s-solubilità tal-ilma. Għal sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu fl-ilma, jista' jkun hemm bżonn li tiġi ppreparata soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata ħafna jew dispersjoni tas-sustanza bl-użu ta' solvent organiku jew dispersant sabiex tiffaċilita ż-żieda ta' kwantitajiet eżatt tas-sustanza tat-test lill-midjum tat-test u tgħin f'dispersjoni u x-xoljiment tagħha. Kull sforz għandu jsir sabiex jiġi evitat l-użu ta' materjali bħal dawn. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossiċità riżultanti minn użu ta' solventi jew dispersanti awżiljarji. Pereżempju, solventi użati ta' spiss li ma jikkawżawx fitotossiċità f'konċentrazzjonijiet sa 100 µl l^{-1} jinkludu acetone u dimethylformamide. Jekk jintuża solvent jew dispersant, il-konċentrazzjoni finali tiegħu għandha tiġi rrapurtata u minimizzata kemm jista' jkun (100 $\mu l \cdot l^{-1}$), u kull trattament u kontroll għandu jkollu l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew dispersant. Iktar indikazzjonijiet dwar l-użu ta' dispersanti huma mogħtija fi (11).

1.7.6. **Gruppi tat-test u kontroll**

Tagħrif bil-quddiem dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test lil *Lemna*, eż. minn test li jsib il-gamma, jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test adattati. Fit-test definittiv ta' tossiċità, għandu jkun hemm mill-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test irranġati f'serje ġeometrika. Preferibbilment il-fattur ta' separazzjoni bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test ma għandux jeċċedi 3.2, iżda valur ikbar jista' jintuża meta l-kurva ta' rispons tal-konċentrazzjoni hija ċatta. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni jekk inqas minn ħames konċentrazzjonijiet huma użati. Mill-inqas tliet repliki għandhom jintużaw f'kull konċentrazzjoni tat-test.

Meta tiġi ssettjata l-gamma ta' konċentrazzjonijiet tat-test (għal sejba ta' gamma u/jew għat-test definittiv ta' tossiċità), dawn li ġejjin għandhom jiġi kkunsidrati:

▼M1

— biex tiddetermina EC_x, il-konċentrazzjonijiet tat-test iridu jsostnu l-valur EC_x sabiex tiżgura livell ta' kunfidenza adegwat. Pereżempju, jekk tkun qed tikkalkula l-EC_{50}, l-iktar konċentrazzjoni għolja għandha tkun ikbar mill-valur tal-EC_{50}. Jekk il-valur EC_{50} jinstab barra l-firxa ta' konċentrazzjonijiet tat-test, intervalli ta' kunfidenza assoċjati jkunu kbar u valutazzjoni xierqa tal-fit statistiku tal-mudell tista' ma tkunx possibbli,

— jekk l-għan huwa li jiġu vvalutati l-LOEC/NOEC, l-iktar konċentrazzjoni baxxa tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex it-tkabbir ma jkunx ħafna inqas minn dak tal-kontroll. Barra minn hekk, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejed sabiex it-tkabbir ikun ħafna iktar baxx minn dak tal-kontroll. Jekk dan ma huwiex il-każ, it-test irid jiġi ripetut bl-użu ta' firxa ta' konċentrazzjoni differenti (sakemm l-ogħla konċentrazzjoni ma hijiex fil-limitu ta' solubilità jew il-konċentrazzjoni fil-limitu massimu rikjest, eż. 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Kull test għandu jinkludi kontolli li jikkonsistu f'midjum tal-istess nutrijent, l-istess għadd ta' frondi u kolonji, kundizzjonijiet ambjentali u proċeduri bħall-kontenituri tat-test iżda mingħajr is-sustanza tat-test. Jekk solvent jew dispersant awżiljarju huwa użat, trattament ta' kontroll addizzjonali bis-solvent/dispersant preżenti fl-istess konċentrazzjoni bħal tal-kontenituri għandu jiġi inkluż. L-għadd ta' konteniturі ta' kontroll ripetut (u konteniturі ta' solvent, jekk applikabbli) għandu jkun mill-inqas daqs, u idealment id-doppju, tal-għadd ta' vetturi użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.

Jekk determinazzjoni ta' NOEC ma hijiex rikjesta, id-dižinn tat-test jista' jinbidel biex jiżdied l-għadd ta' konċentrazzjonijiet u jnaqqas l-għadd ta' repliki ta' kull konċentrazzjoni. Madankollu, l-għadd ta' repliki ta' kontroll iridu jkunu mill-inqas tlieta.

1.7.7. **Espożizzjoni**

Kolonji li jikkonsistu minn 2 sa 4 frondi li jidhru huma trasferiti mill-kultura inoculum u huma mpoġġija każwalment fil-konteniturі ta' kontroll f'kundizzjonijiet asettiċi. Kull kontenitur tat-test għandhu jkollu total ta' bejn disa' jew tnax-il frond. L-għadd ta' frondi u kolonji jridu jkunu l-istess bħal dawk użati f'kull kontenitur tat-test. Esperjenza miksuba b'dan il-metodu u dejta tar-ring-test indikaw li jekk tuża tliet repliki għal kull trattament, b'kull replika jkollha minn disa' sa' tnax-il frond fil-bidu, dan huwa biżżejjed biex tinduna b'differenzi fit-tkabbir ta' ċirka 4 sa 7 % ta' inibizzjoni kkalkulat bir-rata ta' tkabbir (10 sa 15 % ikkalkulata skont ir-rendiment) bejn it-trattamenti (10).

Dižinn każwali għal post ta' konteniturі tat-test fl-inkubatur huwa rikjest sabiex titnaqqas kemm jista' jkun l-influwenza ta' differenzi ta' spazju fl-intensità tad-dawl jew it-temperatura. Dižinn ibblokkat jew ripożizzjonament każwali tal-konteniturі meta jsiru osservazzjonijiet (jew ripożizzjonament iktar frekwenti) hu rikjest ukoll.

▼M1

Jekk test preliminari ta’ stabbilità juri li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ma tistax tinżamm (i.e. il-konċentrazzjoni imkejla taqa’ taħt 80 % tal-konċentrazzjoni inizjali mkejla) matul it-tul taż-żmien tat-test (sebat ijiem), l-użu ta' sistema ta’ ttestjar semistatiku hu rrakkomandat. F’dan il-każ, il-kolonji għandhom jiġu esposti għal soluzzjonijiet tat-test u kontroll preparati mill-ġdid f’mill-inqas żewġ okkażjonijiet matul it-test (eż. ġranet 3 u 5). Il-frekwenza ta’ espożizzjoni għal midjum ġdid jiddependi mill-istabbilità tas-sustanza tat-test; frekwenza iktar għolja tista’ tkun neċessarja biex jinżammu konċentrazzjonijiet kważi-kostanti ta’ sustanzi instabbli ħafna u volatili. F’xi ċirkustanzi, proċedura flow-through tista’ tkun neċessarja (11)(13).

Ix-xenarju ta’ espożizzjoni minn applikazzjoni ta’ weraq (sprej) mhijiex koperta f’dan il-Metodu ta' ttestjar, iżda ara (14).

1.7.8. **Kundizzjonijiet ta’ inkubazzjoni**

Dawl kontinwu fluworexxenti sħun jew frisk għandu jintuża biex jipprovdi intensità tad-dawl magħzula minn għażla ta’ 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ meta mkejjel f’radjazzjoni attiva fotosintetika (400-700 nm) f’punti fl-istess distanza mis-sors ta’ dawl bħall-frondi *Lemna* (ekwivalenti għal 6 500-10 000 lux). Kull differenza mill-intensità tad-dawl magħżula fuq l-erja tat-test ma tistax tkun iktar minn ± 15 %. Il-metodu ta’ rivelazzjoni u kejl ta’ dawl, partikolarment it-tip ta’ sensur, jaffetwa l-valur imkejjel. Sensuri sferiċi (li jirrispondu għal dawl mill-angli kollha ta’ fuq jew taħt il-pjan ta’ kejl) u sensuri “cosine” (li jirrispondu għal dawl mill-angli kollha fuq il-pjan ta’ kejl) huma aħjar minn sensuri unidirezzjonali, u jagħtu riżultati ogħla għal sors ta’ iktar minn punt wieħed tat-tip deskritt hawn.

It-temperatura fil-kontenituri tat-test trid tkun ta’ 24 ± 2 °C. Il-pH tal-midjum ta’ kontroll ma għandiex tiżdied b’iktar minn 1,5 unità matul it-test. Madankollu, devjazzjoni ta' aktar minn 1,5 unità ma tinvalidax it-test meta jkun jista' jintwera li l-kriterji ta' validità ġew issodisfati. Trid tingħata kura addizzjonali għall-pH drift f'każijiet speċjali bħal meta jiġu ttestjati sustanzi li mhumiex stabbli jew metalli. Ara (11) għal iktar indikazzjonijiet.

1.7.9. **Tul ta' żmien**

Dan it-test jintemm sebat ijiem wara li l-pjanti jiġu ttrasferiti fil-kontenituri tat-test.

1.7.10. **Kejl u determinazzjonijiet analitiċi**

Fil-bidu tat-test, l-għadd ta' frondi fil-kontenituri tat-test jingħadd u jiġi rrekordjat, b’attenzjoni li tiżgura li frondi sporġenti li jidhru b’mod ċar, huma kkunsidrati. Numri ta’ frondi li jidhru normali jew anormali, għandhom jiġu determinati fil-bidu tat-test, mill-inqas darba kull tlett ijiem matul il-perjodu ta’ espożizzjoni (i.e. f’mill-inqas 2 okkażjonijiet matul il-perjodu ta’ 7 ijiem), u meta t-test jiġi mitmum. Tibdil fl-iżvilupp tal-pjanti, eż. fid-daqs tal-frond, dehra, indikazzjoni ta’ nekroži, klorożi jew gibbożità, xoljiment ta’ kolonji u telf ta’ abilità li żżomm f’wiċċ l-ilma, u fit-tul u dehra ta’ għeruq, għandhom jiġu nnutati. Karatteristiċi sinifikanti tal-midjum tat-test (eż preżenza ta’ materjal li ma nħallx, tkabbir ta’ alga fil-kontenitur tat-test) għandhom jiġu nnutati.

▼**M1**

Barra minn determinazzjonijiet tal-għadd ta' frondi matul it-test, l-effetti tas-sustanza tat-test fuq waħda (jew iktar) mill-varjabbli ta' kejl li ġejjin huma vvalutati wkoll:

(i) erja totali tal-frond,

(ii) piż niexef,

(iii) piż frisk

L-erja totali tal-frond għandha l-vantaġġ li tista' tiġi ddeterminata għal kull test u l-kontenitur tal-kontroll fil-bidu, matul u fit-tmiem tat-test. Piż niexef jew frisk għandu jiġi ddeterminat fil-bidu tat-test minn kampjun ta' kultura ta' inoculum rappreżentativ ta' dak li jkun użat biex jinbeda t-test, u fit-tmiem tat-test bil-materjal ta' pjanti minn kull kontenitur tat-test u kontroll. Jekk l-erja ta' frond ma tkunx imkejla, piż niexef huwa preferut fuq piż frisk.

L-erja totali tal-frond, piż niexef u piż frisk jistgħu jiġu ddeterminati kif ġej:

(i) *Erja totali tal-frond*: L-erja totali tal-frond tal-kolonji kollha tista' tiġi ddeterminata permezz ta' analiżi tal-immaġini. Dell tal-kontenitur tat-test jista' jiġi miġbud permezz ta' kamera tal-vidjo (i.e. billi l-kontenitur jitpoġġa fuq kaxxa ta' dawl) u l-immaġini li tirriżulta tinqaleb għal waħda diġitali. Bil-kalibrazzjoni ma' forom ċatti ta' erja magħrufa, l-erja totali tal-frond f'kontenitur tat-test tista' tiġi mbagħad iddeterminata. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi eskluża interferenza kkważata mill-bordura tal-kontenitur tal-vettura. Approċċ alternattiv iżda li jieħu iktar xogħol huwa li jittieħdu ritratti tal-kontenituri tat-test u pjanti, taqta' d-dell tal-kolonji li jirriżulta u tiddetermina l-erja tagħhom permezz ta' analizzatur ta' erja ta' weraq jew karti millimetrati. Tekniki oħra (eż. ir-ratio ta' toqol ta' karta bejn l-erja ta' dell tal-kolonji u l-erja ta' unità) jistgħu jkunu adegwati wkoll.

(ii) *Piż niexef*: Il-kolonji kollha huma miġbura minn kull kontenitur tat-test u maħsulin b'ilma distillat jew dejonizzat. L-ilma żejjed tagħhom jitneħħa billi jiġi assorbit u mbagħad huma jiġu mnixxfa f'60 °C għal piż kostanti. Kull biċċiet ta' għeruq għandhom jiġu inklużi. Il-piż niexef għandu jiġi espress b'eżattezza ta' mill-inqas 0,1 mg.

(iii) *Piż frisk*: Il-kolonji kollha huma trasferiti għal ġo tubi li jkunu ntiżnu qabel, magħmula minn polistrene (jew materjal ieħor li ma jagħmilx reazzjoni kimika), b'toqob żgħar (ta' 1 mm) fil-qiegħan tondi. It-tubi huma mbagħad ċentrifugati bi 3 000 rpm għal 10 minuti f'temperatura ambjentali. Tubi, li issa jkun fihom kolonji mnixxfa, huma miżuna mill-ġdid u l-piż frisk huwa kkalkulat billi jitnaqqas il-piż tat-tubu vojt.

1.7.10.1. *Frekwenza ta' kejl u determinazzjoni analitika*

Jekk tintuża sistema ta' ttestjar statiku, il-pH għandha tiġi mkejla fil-bidu u fit-tmiem tat-test. Jekk tintuża sistema ta' ttestjar semistatiku, il-pH għandha tiġi mkejla f'kull lott ta' soluzzjoni tat-test "ġdida" qabel kull tiġdid u f'soluzzjonijiet korrispondenti "użati".

▼M1

L-intensità tad-dawl għandha tiġi mkejla fil-kamra ta' tkabbir, inkubatur jew kamra f'punti fl-istess distanza mis-sors ta' dawl bħall-frondi *Lemna*. Kejl irid isir mill-inqas darba matul it-test. It-temperatura tal-midjum fil-kontenitur sostitwit miżmum fl-istess kundizzjonjiet tal-kamra ta' tkabbir, inkubatur jew kamra għandhom jiġu rreġistrati mill-inqas darba kuljum.

Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test huma ddeterminati f'intervalli xierqa. F'testijiet statiċi, ir-rekwiżit minimu huwa li jiġu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet fil-bidu u fit-tmiem tat-test.

F'testijiet semi-statiċi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ma hijiex mistennija li tibqa' fi ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, hu neċessarju li f'kull tiġdid jiġu analizzati s-soluzzjonijiet tat-test preparati riċentement u l-istess soluzzjonijiet (ara t-tielet paragrafu fit-taqsima 1.7.7). Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza tat-test mhix fi ± 20 % tan-nominali, iżda fejn evidenza suffiċjenti tista' tiġi pprovduta biex turi li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (i.e. fil-gamma 80-120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jsiru biss fuq l-ogħla u l-iktar konċentrazzjonijiet baxxi tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test qabel it-tiġdid hemm biss bżonn li ssir f'replika waħda f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tal-kontenituri miġbura skont ir-replika).

Jekk jintuża test flow-through, sistema ta' teħid ta' kampjuni simili għal dak deskritt għal testijiet semi-statiċi, inkluż l-analiżi fil-bidu, fin-nofs u fit-tmiem tat-test, huwa adegwat, iżda l-kejl ta' soluzzjonijiet "użati" mhux idoneju f'dan il-każ. F'dan it-tip tat-test, ir-rata ta' fluss ta' dilwent u sustanzi tat-test jew soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata ta' sustanza tat-test għadhom jiġu ċċekjati kuljum.

Jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza li qiegħda tiġi ttestjata kienet miżmuma b'mod sodisfaċenti fi ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew dik imkejla inizjalment, matul it-test, analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq il-valuri nominali jew inizjali imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni nominali jew dik inizjali mkejla hija ikbar minn ±20 %, analiżi tar-riżultati għandha tkun imsejsa fuq il-medja ġeometrika tal-konċentrazzjoni matul l-espożizzjoni jew mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (11).

1.7.11. **Test tal-limitu**

F'għadd ta' ċirkustanzi, eż. meta test preliminarju jindika li s-sustanza tat-test ma għandha ebda effetti tossiċi fuq konċentrazzjonijiet sa 100 mg l^{-1}, jew sal-limitu tas-solubilità fil-midjum tat-test (liema minnhom huwa l-iktar baxx), jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi tqabbil ta' reazzjonijiet fi grupp ta' kontroll u grupp ta' trattament (100 mg l^{-1} jew konċentrazzjoni daqs il-limitu tas-solubilità). Huwa rrakkomandat b'enfasi li dan ikun mgħejjun b'analiżi tal-konċentrazzjoni ta' espożizzjoni. Il-kundizzjonijiet tat-test u l-kriterji ta' validità kollha deskritti qabel japplikaw għat-test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li l-għadd ta' repliki ta' trattament irid ikun irduppjat. Tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz tat-test statistiku li jqabbel ir-riżultati medji, eż. Student's t-test.

▼M1

2. **DEJTA U RAPPURTAR**

2.1. ĦIN TA' RDUPPJAR

Biex jiġi ddeterminat iż-żmien ta' rduppjar (T_d) tal-għadd tal-frondi u l-aderenza ma' dan il-kriterju ta' validità bl-istudju (it-taqsima 1.6), il-formula li ġejja hija użata f'limkien ma' dejta miġjuba mill-kontenituri tal-kontroll:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

fejn μ hija r-rata ta' medja ta' tkabbir speċifiku ddeterminat kif deskritt fl-ewwel u fit-tieni paragrafu fit-taqsima 2.2.1.

2.2. VARJABBLI TA' RISPONS

L-għan tat-test hu li jiddetermina l-effett tas-sustanza tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv ta' *Lemna*. Dan il-Metodu ta' ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli ta' rispons, għax pajjiżi membri għandhom preferenzi u bżonnijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-testijiet ikunu aċċettabli fil-pajjiżi membri kollha, l-effetti għandhom jiġu vvalutati billi jintużaw kemm il-varjabbli (a) u kemm dik (b) li huma deskritti hawn taħt.

(a) Ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkulat mhux biss fuq il-bażi ta' bidliet fil-logaritmi tan-numri tal-frond, iżda wkoll fuq il-bażi ta' bidliet fil-logaritmi ta' parametru ieħor ta' kejl (erja totali tal-frond, piż niexef u piż frisk) fuq il-ħin (espress bħala ġranet) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament. Xi drabi issir referenza għal dan bħala rata relattiva ta' tkabbir (15).

(b) Rendiment: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkulat mhux biss fuq il-bażi ta' bidliet fl-għadd tal-frondi, iżda wkoll fuq il-bażi ta' bidliet f'parametru ieħor ta' kejl (erja totali tal-frond, piż niexef u piż frisk) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament sat-tmiem tat-test.

Għandu jiġi nnutat li l-valuri ta' tossiċità kkalkulati permezz tal-użu ta' dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma jistgħux jiġu mqabbla u din id-differenza trid tiġi rikonoxxuta meta r-riżultati tat-test jiġu użati. Valuri EC_x ibbażati fuq rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) ikunu ġeneralment ogħla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-Metodu ta' ttestjar jiġu rrispettati, minħabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Dan ma għandux ikun interpretat bħala differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, sempliċement għax il-valuri huma differenti matematikament. Il-kunċett ta' rata medja ta' tkabbir speċifiku huwa bbażat fuq il-mudell ġenerali ta' tkabbir esponenzjali ta' duckweed f'kulturi mhux limitati, fejn it-tossiċità hija kkalkulata fuq il-bażi tal-effetti fuq ir-rata ta' tkabbir mingħajr ma tkun dipendenti fuq il-livell assolut tar-rata speċifika ta' tkabbir tal-kontroll, il-pendil tal-kurva konċentrazzjoni-rispons jew fuq id-dewmien tat-test. B'kuntrast, riżultati bbażati fuq il-varjabbli ta' rispons tar-rendiment huma dipendenti fuq dawn il-varjabbli l-oħrajn kollha. E_yC_x hija dipendenti fuq ir-rata speċifika ta' tkabbir tal-ispeċje tad-duckweed użata fit-test u fuq ir-rata massima speċifika ta' tkabbir li tista' tvarja bejn speċi jew anki kloni differenti. Dan il-varjabbli ta' rispons ma għandux jintuża biex tqabbel is-sensittivita għal sustanzi tossiċi fost l-ispeċi tad-duckweed jew anki kloni differenti. Waqt li l-użu ta' rata medja speċifika ta' tkabbir biex tikkalkula t-tossiċita hija xjentifikament preferuta, kalkoli ta' tossiċità bbażati fuq rendiment huma inklużi wkoll f'dan il-Metodu ta' ttestjar biex jissodisfaw ir-rekwiżiti regolatorji f'xi pajjiżi.

▼M1

Kalkoli ta’ tossiċità għandhom ikunu bbażati fuq l-għadd tal-frondi u fuq varjabbli ta’ kejl ieħor addizzjonali (erja totali tal-frond, piż niexef u piż frisk), għaliex xi sustanzi jistgħu jaffetwaw varjabbli oħra ta’ kejl ħafna iktar mill-għadd tal-frondi. Dan l-effett ma jiġix rivelat billi tikkalkula l-għadd tal-frondi biss.

L-għadd ta' frondi kif ukoll kull varjabbli ieħor ta’ kejl reġistrat, i.e. erja totali tal-frond, piż niexef jew piż frisk, huma mniżżlin f’tabella flimkien mal-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test ta’ kull okkażjoni ta’ kejl. Analiżi tad-dejta sussegwenti eż. biex tikkalkula LOEC, NOEC jew EC_x għandhom ikunu bbażati fuq il-valuri għar-repliki individwali u mhux fuq medji kkalkulati għal kull grupp ta’ trattament.

2.2.1. **Ir-rata medja ta’ tkabbir speċifiku**

Ir-rata medja ta’ tkabbir speċifiku għal perjodu speċifiku tiġi kkalkulata fuq iż-żjieda logaritmika fil-varjabbli ta’ tkabbir — numri ta’ frond u varjabbli ieħor ta’ kejl (erja totali ta’ frond, piż niexef jew piż frisk) — billi tintuża l-formula ta’ hawn taħt għal kull replika ta’ kontroll u trattamenti:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

fejn:

— μ_{i-j}: rata medja ta’ tkabbir speċifiku minn ħin i sa j

— N_i: varjabbli ta’ kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f’ħin i

— N_j: varjabbli ta’ kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f’ħin j

— t: perjodu ta’ ħin minn i sa j

Għal kull grupp ta’ trattament jew kontroll, ikkalkula valur medju għar-rata ta’ tkabbir flimkien mal-estimi tal-varjazzjoni.

Ir-rata medja ta’ tkabbir speċifiku għandha tkun ikkalkulata għal-perjodu sħiħ tat-test (ħin “i” fil-formula ta’ hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-ħin “j” huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test jew kontroll, ikkalkula valur medju għar-rata medja ta’ tkabbir flimkien mal-estimi tal-varjazzjoni. Għandha tiġi wkoll stimata r-rata ta’ tkabbir sezzjoni b’sezzjoni sabiex jiġu vvalutati effetti tas-sustanza tat-test li jivverifikaw ruħhom matul il-perjodu ta’ espożizzjoni (eż. billi jiġu eżaminati l-kurvi ta’ tkabbir trasformati f’logaritmi). Differenzi sostanzjali bejn ir-rata ta’ tkabbir sezzjoni b’sezzjoni u r-rata medja ta’ tkabbir jindikaw devjazzjoni mit-tkabbir esponenzjali kostanti u għandha issir eżaminazzjoni bir-reqqa tal-kurvi ta’ tkabbir. F’dan il-każ, approċċ konservattiv ikun li jiġu mqabbla r-rati ta’ tkabbir speċifiku minn kulturi ittrattati waqt il-perjodu ta’ ħin ta’ inibizzjoni massima ma’ kontrolli waqt l-istess perjodu ta’ ħin.

▼M1

Persentaġġ ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir (I_r) jista' jiġi kkalkulat fuq kull konċentrazzjoni tat-test (grupp ta' trattament) bil-formula li ġejja:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

fejn:

— % I_r: persentaġġ ta' inibizzjoni fir-rata medja ta' tkabbir speċifiku

— μ_C: valur medju għal μ fil-kontroll

— μ_T: valur medju għal μ fil-grupp ta' trattament

2.2.2. **Rendiment**

Effetti fuq ir-rendiment huma determinati fuq il-bażi ta' żewġ varjabbli ta' kejl, għadd ta' frondi u varjabbli ieħor ta' kejl (erja totali ta' frond, piż niexef u piż frisk) preżenti f'kull kontenitur tat-test fil-bidu u fit-tmiem tat-test. Għal piż niexef u piż frisk, il-bijomassa tal-bidu hija ddeterminata fuq il-bażi ta' kampjun ta' frondi meħud mill-istess lott użat biex tlaqqam il-kontenituri tat-test (ara t-tieni paragrafu fit-taqsima 1.7.3). Għal kull konċentrazzjoni tat-test jew kontroll, ikkalkula valur medju għar-rendiment flimkien mal-estimi tal-varjazzjoni. Il-persentaġġ medju ta' inibizzjoni f'termini ta' rendiment (% I_y) tista' tiġi kkalkulata għal kull grupp ta' trattament kif ġej:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

fejn:

— % I_y: persentaġġ tat-tnaqqis fir-rendiment

— b_C: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għall-grupp ta' kontroll

— b_T: bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu fil-grupp ta' trattament

2.2.3. **Ipplottjar ta' kurvi ta' rispons ta' konċentrazzjoni**

Għandhom jiġu pplottjati l-kurvi ta' rispons ta' konċentrazzjoni li juru l-persentaġġ medju ta' inibizzjoni tal-varjabbli tar-rispons (I_r, jew I_y ikkalkulat kif muri fl-aħħar paragrafu tat-taqsima 2.2.1 jew fit-taqsima 2.2.2) u l-konċentrazzjoni logaritmika tas-sustanza tat-test.

2.2.4. **Estimi ta' EC_x**

Estimi ta' EC_x (eż. EC_{50}) għandhom dejjem ikunu bbażati kemm fuq ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) kif ukoll fuq ir-rendiment (E_yC_x), u t-tnejn li huma għandhom ikunu bbażati fuq l-għadd tal-frondi u varjabbli ieħor ta' kejl (erja totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk). Dan għaliex hemm sustanzi tat-test li jinfluwenzaw l-għadd ta' frondi u l-varjabbli ta' kejl oħra b'mod differenti. Il-parametri ta' tossiċità mixtieqa huma għalhekk erba' valuri EC_x għal kull livell ta' inibizzjoni kkalkulat: E_rC_x (għadd tal-frondi); E_rC_x (erja totali tal-frondi, piż niexef, jew piż frisk); E_yC_x (għadd tal-frondi); u E_yC_x (erja totali tal-frondi, piż niexef, jew piż frisk).

▼M1

2.3. PROĊEDURA STATISTIKA

L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni konċentrazzjoni-rispons permezz ta' analiżi ta' regressjoni. Huwa possibbli li tiġi użata regressjoni medja lineari wara li ssir trasformazzjoni linearizzanti tad-dejta ta' rispons — pereżempju f'unità probit jew logit jew Weibull (16), iżda proċeduri non-lineari ta' regressjoni huma ppreferuti għax jittrattaw aħjar l-irregolaritajiet inevitabbli ta' dejta u d-devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet lixxi. Qrib l-inibizzjoni żero jew inibizzjoni totali, dawn l-irregolaritajiet jistgħu jiġu mkabbra bit-trasformazzjoni, u dan ifixkel l-analiżi (16). Għandu jiġi nnutat li l-metodi standard ta' analiżi li jużaw trasformazzjonijiet probit, logit jew Weibull huma maħsuba għal użu fuq dejta ta' natura quantal (eż. mortalità jew sopravivenza), u għandhom jiġu mmodifikati biex jagħmlu tajjeb għal dejta tar-rata ta' tkabbir jew rendiment. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinstabu fi (17), (18), u (19).

Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x. Fejn huwa possibbli, il-limiti ta' kunfidenza tal-95 % għal kull stima għandhom jiġu ddeterminati. Il-livell ta' kemm huwa tajjeb l-adattament tad-dejta ta' rispons għall-mudell ta' regressjoni għandu jiġi stmat grafikament jew statistikament. L-analiżi ta' regressjoni għandha ssir bl-użu ta' risponsi ta' repliki individwali, u mhux medji ta' gruppi ta' trattament.

Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jinkisbu bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (20), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibbli mhumiex xierqa għad-dejta.

Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa neċessarju li jiġu mqabbla l-medji ta' trattament permezz ta' użu ta' analiżi ta' tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja ta' kull konċentrazzjoni għandha mbagħad tiġi mqabbla mal-medja ta' kontroll billi jintuża metodu xieraq ta' paragun multiplu jew metodu tat-test trend. Test ta' Dunnett jew Williams jista' jkun utli (21)(22)(23)(24). Huwa neċessarju li tivvaluta jekk l-ipotesi ANOVA ta' omoġeneità ta' varjanza treġix. Din il-valutazjoni tista' ssir grafikament jew b'test formali (25). Testijiet adegwati huma dak ta' Levene jew Bartlett. Nuqqas li tintlaħaq l-ipotesi ta' omoġeneità ta' varjanzi tista' xi drabi tiġi kkoreġuta permezz ta' trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, analiżi b'metodi bħal testijiet ta' trend 'l isfel Jonkheere għandhom jiġu kkunsidrati. Iktar indikazzjoni dwar id-determinazzjoni tal-NOEC tista' tinstab f' (19).

Żviluppi xjentifiċi riċenti wasslu għal rakkomandazzjoni biex jiġi abbandunat il-kunċett tal-NOEC u minflok jinbidel bi stimi EC_x ta' punti bbażati fuq regressjoni. Valur xieraq għal x ma ġiex stabbilit għal dan il-*Lemna* test. Madankollu, sensiela ta' minn 10 sa 20 % tidher xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment l-EC_{10} u l-EC_{20} għandhom jiġu rrapurtati t-tnejn li huma.

3. **RAPPURTAR**

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dawn li ġejjin:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u l-proprjetajiet fiżikokimiċi, li jinkludu l-limitu ta' solubilità tal-ilma;

▼M1

— dejta ta’ identifikazzjoni kimika (eż. In-Numru CAS), li tinkludi l-purità.

Speċi tat-test:

— isem xjentifiku, klonu (jekk magħruf) u sors.

Kundizzjonijiet tat-test:

— il-proċedura tat-test użat (statiku, semi-statiku jew flow-through);

— id-dejta tal-bidu tat-test u d-dewmien tiegħu;

— il-midjum tat-test:

— deskrizzjoni tad-diżinn sperimentali: kontenituri tat-test u għata, volumi ta’ soluzzjoni, għadd ta' kolonji u frondi kull kontenitur tat-test fil-bidu tat-test;

— konċentrazzjoniet tat-test (nominali u mkejla kif inhu xieraq) u għadd ta' repliki għal kull konċentrazzjoni:

— metodi ta’ preparazzjoni ta’ materjal b'konċentrazzjoni standard-izzata u soluzzjonijiet tat-test li jinkludi l-użu ta’ xi solventi jew dispersanti;

— temperatura matul it-test;

— sors ta’ dawl, intensità tad-dawl u omoġeneità;

— valuri ta’ pH tat-test u tal-midja ta’ kontroll;

— konċentrazzjonijiet ta’ sustanzi tat-test u l-metodu ta’ analiżi b’dejta xierqa ta’ ivvalutar ta’ kwalità (studji ta’ validazzjoni, devjazzjonijiet standard u l-limiti ta’ kunfidanza ta’ analiżi);

— metodi għal determinazzjoni tal-għadd tal-frondi u varjabbli ieħor ta’ kejl eż. piż niexef, piż frisk u erja ta’ frond;

— kull devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' ttestjar.

Riżultati:

— dejta mhux elaborata: għadd ta' frondi u varjabbli oħra ta’ kejl f’kull test u kontenitur ta’ kontroll f’kull osservazzjoni u okkażjoni ta’ analiżi;

— medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta’ kejl;

— kurvi ta’ tkabbir għal kull konċentrazzjoni (irrakkomandata ma’ varjabbli ta’ kejl logaritmikament trasformat, ara t-tieni paragrafu fit-taqsima 2.2.1);

— ħin ta’ rduppjar/rata ta’ tkabbir fil-kontroll ibbażat fuq l-għadd ta' frondi;

— varjabbli ta’ rispons ikkalkulati għal kull replika ta’ trattament, b’valuri medji u varjazzjoni ta’ koeffiċjent għar-repliki;

— rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni konċentrazzjoni/effett;

— stimi ta’ punti ta’ tmiem tossiċi għal varjabbli ta’ rispons eż. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, u l-intervalli ta’ kunfidenza assoċjati. Jekk ikkalukulati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi ta’ statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom;

▼M1

— jekk ANOVA kienet użata, id-daqs tal-effett li jista' jiġi individwat (eż. id-differenza l-inqas sinifikanti);

— kull stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba f'kull trattament;

— kull sinjal li jidher ta' fitotossiċità u kif ukoll osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test;

— diskussjoni tar-riżultati, li tinkludi kull influwenza fuq ir-riżultat tat-test li ħarġet minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' ttestjar.

4. **LETTERATURA**

(1) OECD TG 221 (2006) Lemna Sp. Growth Inhibition Test

(2) The use of Lemna studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

(6) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

(8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37-120 pp

(9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.*). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M1

Appendiċi 1

Deskrizzjoni ta' *Lemna* spp.

Il-pjanta akkwatika li komunement tissejjaħ bħala ħażiż li jgħatti l-wiċċ tal-ilma qiegħed (duckweed), Lemna spp., hija parti mill-familja Lemnaceae li għandha għadd ta' speċi madwar id-dinja f'erba' ġenera. Id-dehra u t-tassonomija differenti tagħhom ġew deskritti b'mod sħiħ (1)(2). *Lemna gibba* u *L. minor* huma speċi rappreżentattivi ta' postijiet b'temperatura moderata u huma komunement użati għal testijiet ta' tossiċità. Iż-żewġ speċi għandhom werqa biz-zokk (frond) tonda li żżomm fil-wiċċ jew taħt il-wiċċ tal-ilma, u għerq irqiq ħafna joħroġ minn nofs tal-wiċċ l-iktar baxx ta' kull frond. Lemna spp. rari tipproduċi fjuri u l-pjanti jitnisslu billi veġetattivament jipproduċu frondi ġodda (3). B'kuntrast ma' pjanti ixjaħ, iż-żgħar għandhom it-tendenza li jkunu iktar ċari, li jkollhom għeruq iqsar u jikkonsisti minn tnejn sa tliet frondi ta' daqsijiet differenti. Id-daqs żgħir ta' *Lemna*, l-istruttura sempliċi tagħha, ir-riproduzzjoni u l-ħin qasir ta' ġenerazzjoni jagħmlu pjanti ta' dan il-ġeneru tajbin ħafna għal ittestjar fil-laboratorju (4)(5).

Minħabba differenza probabbli bejn l-ispeċi, fis-sensittività, paraguni ta' sensittività fost speċi waħda biss huma validi.

Eżempji ta' speċi ta' *Lemna* li ġew użati għal ittestjar: Referenza għal Speċi

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga Ceramium strictum and the duckweed Lemna aequinoctialis in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of Lemna major as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (bl-Iżvediż).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Sorsi ta' speċijiet ta' *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
United States
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 STOCKHOLM
SWEDEN
Tel: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
e-mail: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Letteratura

(1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼M1

Appendiċi 2

Manteniment ta’ kulturi b'konċentrazzjoni standardizzata

Kulturi b'konċentrazzjoni standardizzata jistgħu jiġu miżmuma f’temperaturi iktar baxxi (4-10 °C) għal ħinijiet itwal mingħajr il-bżonn li jerġgħu jsiru mill-ġdid. Il-midjum ta’ tkabbir ta’ Lemna jista’ jkun l-istess bħal dak użat għal ittestjar iżda midja oħra rikka fin-nutrijenti tista’ tintuża għal kulturi b'konċentrazzjoni standardizzata.

Kull tant żmien, għadd ta' pjanti żgħar ta’ lewn aħdar ċar jitpoġġew f’kontenituri ġodda ta’ kultura li fihom ikun hemm midjum ġdid b’teknika asettika. Skont il-kundizzjonijiet iktar kesħin irrakkomandati hawn, sub-kultura tista’ ssir f’intervalli ta’ massimu ta’ tliet xhur.

Kontenituri tal-ħġieġ ta’ kultura li huma kimikament nodfa (maħsulin bl-aċidu) u sterili għandhom jintużaw u tekniki asettiċi ta’ maneġġjar għandhom jiġu implimentati. F’każ ta’ kontaminazzjoni ta’ kultura b'konċentrazzjoni standardizzata eż minn alga jew faqqiegħ, għandhom jittieħdu passi biex organiżmi ta’ kontaminazzjoni jiġu eliminati. Fil-każ ta’ alga u ħafna mill-organiżmi ta’ kontaminazzjoni oħrajn, dan jista’ jsir permezz ta’ sterilizzazzjoni. Kampjun tal-materjal ta’ pjanti kontaminat għandu jittieħed u l-għeruq jinqatgħu. Dan il-materjal jiġi mbagħad imlaħlaħ b’saħħa f’ilma nadif, u mbagħad mgħaddas ġo soluzzjoni 0,5 % (v/v) sodium hypochlorite għal bejn 30 sekonda u 5 minuti. Il-materjal ta’ pjanti huwa mbagħad imlaħlaħ b’ilma sterili u trasferit, bħala għadd ta' lottijiet, f’kontenituri ta’ kultura li fihom ikun hemm midjum ta’ tkabbir frisk. Ħafna frondi jmutu bħala riżultat ta’ dan it-trattament, speċjalment jekk jintużaw perjodi ta’ espożizzjoni itwal, imma xi wħud minn dawk li jsalvaw ikunu ġeneralment ħielsa minn kontaminazzjoni. Dawn jistgħu mbagħad jintużaw biex jerġgħu jlaqqmu kulturi ġodda.

▼M1

Appendiċi 3

Midja

Midja differenti ta' tkabbir huma rrakkomandati għal *L. minor u L. gibba*. Għal *L. minor*, midjum ta' Standard Svediż (SIS) modifikat huwa rrakkomandat waqt li għal *L. gibba*, midjum 20X AAP huwa rrakkomandat. Kompożizzjonijiet taż-żewġ midja huma mogħtija hawn taħt. Meta dawn il-midja jiġu ppreparati, reagent jew sustanzi kimiċi ta' grad analitiku u ilma dejonizzat għandhom jintużaw.

Standard Svediż (SIS) midjum ta' tkabbir ta' Lemna

— Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata I-V huma sterilizzati b'awtoklavazzjoni (120 °C, 15 minuti) jew b'tisfija minn membrana (b'daqs tal-pori ta' ċirka 0,2 m).

— Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata VI (u VII bħala għażla oħra) huma sterilizzati biss permezz ta' tisfija minn membrana; dawn ma għandhomx jiġu awtoklavati.

— Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata sterili għandhom jinħaznu f'kundizzjonijiet friski u mudlama. Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata I-V għandhom jintremew wara sitt xhur waqt li soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata VI (u VII bħala għażla oħra) jiskadu wara xahar.

Soluzzjoni B'konċentrazzjoni standardizzata Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata (g l^{-1})	Konċentrazzjoni fil-midjum ippreparat (mg l^{-1})	Midjum ippreparat	
				Element	Konċentrazzjoni (mg·l^{-1})
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buffer)	490	490	—	—

— Sabiex tipprepara litru ta' midjum SIS, dawn li ġejjin jiżdiedu ma' 900 ml ta' ilma dejonizzat:

— 10 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata I

— 5 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata II

— 5 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata III

— 5 ml ta' soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata IV

▼M1

— 1 ml ta’ soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata V

— 5 ml ta’ soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata VI

— 1 ml ta’ soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata VII (jekk trid)

Nota: Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata VII oħra (buffer MOPS) tista’ tkun neċessarja għal ċerti sustanzi tat-test (ara l-aħħar paragrafu fit-taqsima 1.4).

— Il-pH huwa aġġustat għal 6,5 ± 0,2 b’0.1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustat għal litru b’ilma dejonizzat.

Midjum ta’ tkabbir 20X AAP

Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata huma ppreparati f’ilma sterili distillat jew dejonizzat.

Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata sterili għandhom jinħaznu f’kundizzjonijiet friski u mudlama. F’dawn il-kundizzjonijiet is-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata ma jiskadux qabel 6-8 ġimgħat.

Ħames soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata ta’ nutrijent (A1, A2, A3, B and C) huma ppreparati għal midjum 20X — AAP, bl-użu ta’ sustanżi kimiċi ta’ grad reagent. 20 ml ta’ kull soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata ta’ nutrijent huma miżjuda ma’ ċirka 850 ml ta’ ilma dejonizzat biex jiġi prodott il-midjum ta’ tkabbir. Il-pH huwa aġġustat għal 7,5 ± 0,1 b’0,1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustat għal litru b’ilma dejonizzat. Il-midjum jiġi mbagħad imsaffi minn filtru ta’ membrana ta’ (ċirka) 0,2 μm għal ġo kontenitur sterili.

Il-midjum ta’ tkabbir maħsub għal ittestjar għandu jkun ippreparat minn jum sa 2 qabel l-użu sabiex il-pH jilħaq joqgħod. Il-pH ta’ midjum ta’ tkabbir għandu dejjem jiġi kkontrollat qabel l-użu u aġġustat mill-ġdid, jekk neċessarju, biż-żieda ta’ 0,1 jew 1 M NaOH jew HCl kif deskritt hawn fuq.

Soluzzjoni konċentrata Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata (g l^{-1}) (1)	Konċentrazzjoni fil-midjum ippreparat (mg l^{-1}) (*)	Midjum ippreparat	
				Element	Konċentrazzjoni (mg·l^{-1}) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2·6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2·2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4·7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4·3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2·4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3·6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA·2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg·l^{-1}	66 μg·l^{-1}	Zn	31 μg·l^{-1}
	$CoCl_2·6H_2O$	1,4 mg·l^{-1}	29 μg·l^{-1}	Co	7,1 μg·l^{-1}
	$Na_2MoO_4·2H_2O$	7,3 mg·l^{-1}	145 μg·l^{-1}	Mo	58 μg·l^{-1}
	$CuCl_2·2H_2O$	0,012 mg·l^{-1}	0,24 μg·l^{-1}	Cu	0,080 μg·l^{-1}
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Sakemm mhux indikat

▼M1

Nota: Il-konċentrazzjoni finali ta' bikarbonat teoretikament tajba (li tevita aġġustament ta' pH notevoli) hija ta' 15 mg/l, mhux ta' 300 mg/l. Madankollu, l-użu storiku ta' midjum 20X-AAP, inkluż ir-ring test għal dan il-metodu, huwa bbażat fuq 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD Lemna Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

Midjum STEINBERG (skont l-ISO 20079)

Konċentrazzjonijiet u soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata

— Il-midjum Steinberg modifikat huwa użat fl-ISO 20079 għal *Lemna minor* waħedha (għaliex *Lemna minor* biss hija permessa f'dan l-istandard) iżda testijiet urew li riżultati tajbin jistgħu jinkisbu b'*Lemna gibba* wkoll.

— Meta dan il-midjum jiġi ppreparat, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi reagent jew sustanzi kimiċi ta' grad analitiku u ilma dejonizzat.

— Ipprepara l-midjum ta' nutrijent minn soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata jew il-midjum b'konċentrazzjoni standardizzata għal 10 darbiet li jippermetti konċentrazzjoni massima tal-midjum mingħajr preċipitazzjoni.

Tabella 1

Midjum STEINBERG b'pH stabilizzata (modifikat skont Altenburger)

Sustanza		Midjum ta' nutrijenti	
Makroelementi	piż mol	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroelementi	piż mol	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA Disodium-dihydrate	372,24	1 500,00	4,03

▼**M1**

Tabella 2

Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata (Makroelementi)

1. **Makroelementi (b'konċentrazzjoni standardizzata 50 darba)**	g/l
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabella 3

Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata (Mikroelementi)

2. **Mikroelementi (b'konċentrazzjoni standardizzata 1 000 darba)**	mg/l
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 4:	
H_3BO_3	120,0
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA Disodium-dihydrate	1 500,00

— Soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata 2 u 3 u separatament 4 u 7 jistgħu jinġabru flimkien (b'kunsiderazzjoni għal-konċentrazzjonijiet rikjesti).

— Biex ittawwal id-data ta' skadenza, ittratta is-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata f'awtoklavi f'temperatura ta' 121 °C għal 20 min jew inkella għamel tisfija sterili (0,2 μm). Għal soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 8, tisfija sterili (0,2 μm) hija rrakkomandata ħafna.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni finali ta' midjum STEINBERG (modifikat)

— Żid 20 ml ta' soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata 1, 2 u 3 (ara tabella 2) ma' ċirka 900 ml ta' ilma dejonizzat sabiex tevita li sseħħ preċipitazzjoni.

— Żid 1,0 ml ta' soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata 4, 5, 6, 7 u 8 (ara tabella 3).

— Il-pH irid ikun 5,5 ± 0,2 (aġġusta billi żżid volum minimizzat ta' soluzzjoni NaOH jew HCl)

▼**M1**

— Aġġusta bl-ilma għal 1 000 ml.

— Jekk is-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata huma sterilizzati u ilma tajjeb huwa użat ma hemm bżonn l-ebda sterilizzazzjoni oħra. Jekk sterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, is-soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata 8 għandha tiżdied wara awtoklavazzjoni (f'temperatura ta' 121 °C għal 20 min).

Preparazzjoni ta' midjum STEIBERG (modifikat) 10 darbiet b'konċentrazzjoni standardizzata għal ħażna intermedja

— Żid 20 ml ta' soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata nri 1, 2 u 3 (ara t-tabella 2) ma' ċirka 30 ml ta' ilma sabiex tevita li sseħħ preċipitazzjoni.

— Żid 1,0 ml tas-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata nri 4, 5, 6, 7 u 8 (ara t-tabella 3). Aġġusta bl-ilma għal 100 ml.

— Jekk is-soluzzjonijiet b'konċentrazzjoni standardizzata huma sterilizzati u ilma tajjeb huwa użat ma hemm bżonn l-ebda sterilizzazzjoni oħra. Jekk sterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, is-soluzzjoni b'konċentrazzjoni standardizzata nru 8 għandha tiżdied wara l-awtoklavazzjoni (f'temperatura ta' 121 °C għal 20 min).

— Il-pH tal-midjum (konċentrazzjoni finali) għandha tkun 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27. TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA BL-UŻU TA' SEDIMENT IMĦALLAT

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 218 (2004) tal-OECD. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa nfassal biex jivvaluta l-effetti ta' espożizzjoni prolongata tal-kimiċi għal-larvi li jgħixu fis-sediment tad-dipteran tal-ilma ħelu *Chironomus* sp. Huwa bbażat fuq protokolli eżistenti tat-test tat-tossiċità għal *Chironomus riparius* u *Chironomus tentans* li ġew żviluppati fl-Ewropa (1)(2)(3) u fl-Amerika tat-Tramuntana (4)(5)(6)(7)(8) u sarilhom ir-ring test (1)(6)(9). Jistgħu jintużaw ukoll speċijiet oħra ta' kironomidi iddokumentati sewwa, eż. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Ix-xenarju ta' espożizzjoni użat f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa sediment fortifikat bis-sustanza għall-ittestjar. L-għażla tax-xenarju adatt ta' espożizzjoni tiddependi mill-applikazzjoni maħsuba tat-test. Ix-xenarju ta' sediment fortifikat huwa maħsub li jissimula livelli akkumulati ta' kimiċi li jippersistu fis-sediment. Din is-sistema ta' espożizzjoni tinvolvi sediment fortifikat ta' sistema ta' ttestjar ta' sediment-ilma.

3. Sustanzi li jeħtiġilhom ikunu ttestjati għal organiżmi li jgħixu f'sediment is-soltu jippersistu f'dan il-kompartiment tul perjodi twal ta' żmien. L-organiżmi li jgħixu f'sediment jistgħu jkunu esposti permezz ta' għadd ta' rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni u taż-żmien meħud għal kull waħda biex tikkontribwixxi għall-effetti tossiċi globali, tiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika konċernata. Għal sustanzi li jassorbixxu ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5) jew għal sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-inġestjoni ta' ikel kontaminat tista' tkun rotta sinifikanti ta' espożizzjoni. Biex it-tossiċità ta' sustanzi lipofiliċi ħafna ma tkunx sottovalutata, jista' jitqies l-użu ta' ikel miżjud mas-sediment qabel l-applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar. Biex jittieħdu r-rotot potenzjali kollha ta' espożizzjoni l-fokus ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar ikun fuq espożizzjoni fit-tul. It-testijiet idumu madwar 20 - 28 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u 28 - 65 jum għal *C. tentans*. Jekk tkun meħtieġa dejta għal żmien qasir għal għan speċifiku, pereżempju biex ikunu mistħarrġa l-effetti ta' kimika instabbli, replikati addizzjonali jistgħu jitneħħew wara perjodu ta' għaxart ijiem.

4. Il-punti ta' tmiem imkejla huma l-għadd totali ta' adulti li jkunu evolvew u ż-żmien li jkunu ħadu biex evolvew. Huwa rrakkomandat li l-kejl tas-sopravivenza u tat-tkabbir tal-larvi għandu jsir biss wara perjodu ta' għaxart ijiem jekk tkun meħtieġa dejta addizzonali għal żmien qasir, billi jintużaw replikati addizzjonali skont il-każ.

5. Huwa rrakkomandat l-użu ta' sediment formulat. Sediment formulat għandu diversi vantaġġi fuq sedimenti naturali:

— il-varjabbiltà sperimentali titnaqqas minħabba li jifforma "matriċi standardizzata" riproduċibbli u l-ħtieġa li jinstabu sorsi ta' sediment mhux kontaminati u nodfa tkun eliminata;

— it-testijiet jistgħu jibdew f'kull żmien mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà staġonali fis-sediment tat-test u ma jkunx hemm ħtieġa li s-sediment ikun ittrattat minn qabel biex titneħħa fawna indiġena; l-użu ta' sediment formulat inaqqas ukoll l-ispiża b'rabta mal-ġabra mill-post ta' ammonti suffiċjenti ta' sediment għal testijiet ta' rutina;

— l-użu ta' sediment formulat jippermetti li jsiru tqabbiliet ta' tossiċità u gradazzjoni ta' sustanzi b'dan il-mod.

6. Definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

▼M4

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel faża ta' larvi kironomidi jkunu esposti għal firxa ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'sistemi ta' sediment u ilma. Is-sustanza għall-ittestjar tkun iffortifikata fis-sediment u l-larvi tal-ewwel faża mbagħad jiddaħħlu f'bekkijiet tat-test li fihom il-konċentrazzjonijiet ta' sediment u ilma jkunu saru stabbli. Ir-rata ta' evoluzzjoni u żvilupp ta' kironomidi titkejjel fit-tmiem tat-test. Is-sopravivenza u l-piż tal-larvi jistgħu jitkejlu wkoll wara 10 ijiem jekk ikun meħtieġ (billi jintużaw replikati addizzjonali skont kif ikun xieraq). Din id-dejta tkun analizzata jew billi jintuża mudell ta' rigressjoni biex tkun stmata l-konċentrazzjoni li għandha tikkawża x % tnaqqis fl-evoluzzjoni, fis-sopravivenza jew fit-tkabbir tal-larvi (eż. EC_{15}, EC_{50} eċċ.), jew billi jintuża ttestjar ta' ipoteżi ta' statistika biex ikun iddeterminat NOEC/LOEC. Dan tal-aħħar ikun jeħtieġlu tqabbil ta' valuri ta' effett ma' valuri ta' kontroll billi jintużaw testijiet ta' statistika.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA GĦALL-ITTESTJAR

8. Is-solubilità fl-ilma tas-sustanza għall-ittestjar, il-pressjoni tal-fwar tagħha, il-partizzjoni mkejla jew ikkalkulata f'sediment u l-istabbiltà fl-ilma u fis-sediment għandhom ikun magħrufin. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f'ilma ta' fuq, f'ilma tal-pori u f'sediment b'akkuratezza magħrufa u rrapportata u b'limitu ta' detezzjoni. Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali u l-purezza tas-sustanza għall-ittestjar. Dak li jiġrilha kimikament is-sustanza għall-ittestjar (eż. tixrid, degradazzjoni abijotika u bijotika, eċċ.) ukoll huwa informazzjoni utli. Aktar gwida għall-ittestjar ta' sustanzi bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluha diffiċli għalihom li jsirilhom it-test tingħata fi (12).

KIMIĊI TA' REFERENZA

9. Kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu ttestjati perjodikament bħala mezz li jiżgura li l-protokoll tat-test u l-kondizzjonijiet tat-test ikunu affidabbli. Eżempji ta' sustanzi tossiċi ta' referenza użati b'suċċess f'ring-tests u fi studji ta' validazzjoni huma: lindane, trifluralin, pentaklorurfenol, klorur tal-kadmju u klorur tal-potassju (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDITÀ TAT-TEST

10. Biex it-test ikun validu japplikaw il-kondizzjonijiet li ġejjin:

— l-evoluzzjoni fil-kontrolli għandha tkun mill-anqas 70 % fit-tmiem tat-test. (1)(6);

— l-evoluzzjoni ta' C. riparius u C. yoshimatsui għal adulti minn reċipjenti ta' kontroll għandha sseħħ bejn 12 u 23 jum wara li jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti; għal C. tentans, ikun meħtieġ perjodu ta' 20 sa 65 jum.

— fit-tmiem tat-test, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul għandhom jitkejlu f'kull reċipjent. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu għandha tkun mill-anqas 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV) fit-temperatura użata, u l-pH tal-ilma ta' fuq għandu jkun fil-firxa ta' 6-9 fir-reċipjenti kollha tal-ittestjar;

— it-temperatura tal-ilma mhux suppost tvarja b'iktar minn ± 1,0 C. It-temperatura tal-ilma tista' tkun ikkontrollata b'kamra iżotermika u f'dak il-każ it-temperatura tal-kamra għandha tkun ikkonfermata f'intervall xieraq ta' ħin.

▼M4

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Reċipjenti tat-test

11. L-istudju jitwettaq f'bekkijiet tal-ħġieġ ta' 600 ml b'dijametru qies ta' 8 cm. Reċipjenti oħra jkunu tajbin, iżda għandhom jiggarantixxu fond sewwa tal-ilma ta' fuq u tas-sediment. Il-wiċċ tas-sediment għandu jkun suffiċjenti biex jipprovdi 2 sa 3 cm^2 għal kull larva. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tas-sediment mal-fond tal-ilma ta' fuq għandu jkun 1:4. Reċipjenti tat-test u apparat ieħor li jiġu f'kuntatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kollha mill-ħġieġ jew minn materjal ieħor kimikament inerti (eż. Teflon).

Għażla ta' speċi

12. L-ispeċi li għandha tintuża fit-test preferibbilment hija *Chironomus riparius*. Chironomus tentans hija adatta wkoll iżda aktar diffiċli biex tkun ittrattata u jeħtiġilha perjodu itwal ta' test. Tista' tintuża wkoll Chironomus yohimatsui. Dettalji ta' metodi ta' kultura jingħataw fl-Appendiċi 2 għal Chironomus riparius. Informazzjoni dwar kondizzjonijiet ta' kultura hija wkoll disponibbli għal speċijiet oħra, jiġifieri għal Chironomus tentans (4) u Chironomus yoshimatsui (11). L-identifikazzjoni ta' speċijiet għandha tkun ikkonfermata qabel l-ittestjar iżda ma tkunx meħtieġa qabel kull test jekk organiżmi jkunu ġejjin minn kultura interna.

Sediment

13. Preferibbilment għandu jintuża sediment formulat (msejjaħ ukoll sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Iżda, jekk jintuża sediment naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (huma wkoll irrakkomandati mill-anqas pH, kontenut ta' karbonju organiku, determinazzjoni ta' parametri oħra bħal proporzjon ta' C/N u granulumetrija), u għandu jkun ħieles minn kull kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu ma', jew jikkunsmaw lill-kironomidi. Huwa wkoll irrakkomandat li, qabel ma jintuża f'test tat-tossiċità tal-kironomidi, is-sediment naturali jkun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taħt l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti. Huwa rrakkomandat li f'dan it-test jintuża s-sediment formulat li ġej, ibbażat fuq il-ħamrija artifiċjali użata fil-Metodu ta' Ttestjar C.8 (14) (1)(15)(16):

(a) 4-5 % pit (piż fin-niexef): qrib kemm jista' jkun pH 5,5 sa 6,0; huwa importanti li jintuża pit f'għamla ta' trab, mitħun fin (partiċelli ta' daqs ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja biss.

(b) 20 % tafal tal-kawlina (piż fin-niexef) (kontenut ta' kawlina preferibbilment aktar minn 30 %).

(c) 75-76 % ramel tal-quartz (piż fin-niexef) (għandu jippredomina ramel fin b'aktar minn 50 % tal-partiċelli bejn 50 u 200 μm).

(d) Jiżdied ilma dejonizzat biex jinkiseb kontenut ta' rtuba tat-taħlita finali f'firxa ta' 30-50 %.

(e) Jiżdied karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura (CaCO3) biex ikun aġġustat il-pH tat-taħlita finali tas-sediment għal 7,0 ± 0,5. Il-kontenut ta' karbonju organiku tat-taħlita finali għandu jkun 2 % (± 0,5 %) u għandu jkun aġġustat b'ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

14. Is-sors tal-pit, tafal tal-kawlina u ramel għandha tkun magħrufa. Il-komponenti tas-sediment għandhom ikunu eżaminati għan-nuqqas ta' kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti tal-organokloru, komposti organofosforużi, eċċ.). Eżempju għat-tħejjija tas-sediment formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-taħlit ta' kostitwenti nixfin ikun ukoll aċċettabbli jekk jintwera li wara li jkun żdied l-ilma ta' fuq ma sseħħx separazzjoni tal-kostitwenti tas-sediment (eż. biċċiet tal-pit fil-wiċċ tal-ilma), u li l-pit jew is-sediment ikunu kkondizzjonati b'mod suffiċjenti.

▼M4

Ilma

15. Kull ilma li jkun konformi mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma dilwit b'mod aċċettabbli kif elenkat fl-Appendiċijiet 2 u 4 ikun tajjeb bħala ilma tat-test. Kull ilma tajjeb, ilma naturali (ilma tal-wiċċ jew ta' taħt l-art), ilma rikostitwit (ara l-Appendiċi 2) jew ilma tal-vit li jkun tneħħielu l-kloru jkun aċċettabbli bħala ilma ta' kultura u ilma tat-test jekk kironomidi jibqgħu jgħixu fih sakemm idumu l-kultura u t-testjar mingħajr ma juru sinjal ta' stress. Fil-bidu tat-test, il-pH tal-ilma tat-test għandu jkun bejn 6 u 9 u t-total ta' melħ minerali fl-ilma ma jkunx ogħla minn 400 mg/l bħala $CaCO_3$. Iżda, jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni). Għandu jintuża l-istess tip ta' ilma tul l-istudju kollu. Il-karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma elenkati fl-Appendiċi 4 għandhom jitkejlu mill-anqas darbtejn fis-sena jew meta jkun hemm suspett li dawn il-karatteristiċi jkunu setgħu nbidlu b'mod sinifikanti.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet - Sedimenti ffortifikati

16. Sedimenti mħalltin tal-konċentrazzjoni magħżula s-soltu jitħejjew biż-żieda ta' soluzzjoni tas-sustanza għall-ittestjar direttament mas-sediment. Soluzzjoni ta' stokkijiet tas-sustanza għall-ittestjar maħlula f'ilma dejonizzat titħallat mas-sediment formulat b'mitħan romblu, b'mikser tal-għalf jew billi titħallat bl-idejn. Jekk ftit titħallat fl-ilma, is-sustanza għall-ittestjar tista' tinħall f'volum kemm jista' jkun żgħir ta' solvent organiku adatt (eż. eżanu, aċeton jew kloroform). Din is-soluzzjoni mbagħad titħallat ma' 10 g ta' ramel fin tal-quartz għal reċipjent wieħed tat-test. Is-solvent jitħalla jevapora u għandu jitneħħa għal kollox mir-ramel; ir-ramel imbagħad jitħallat mal-ammont adatt ta' sediment għal kull bekk tat-test. Jistgħu jintużaw biss aġenti li jsiru volatili malajr biex iħollu, ixerrdu jew jemulsifaw is-sustanza għall-ittestjar. Huwa mfakkar li għandu jitqies ir-ramel ipprovdut mis-sustanza għall-ittestjar u mit-taħlita tar-ramel meta jkun qed jitħejja s-sediment (jiġifieri s-sediment għandu, għalhekk, jitħejja b'anqas ramel). Għandha tingħata attenzjoni biex ikun żgurat li s-sustanza għall-ittestjar miżjuda mas-sediment titqassam sewwa u ma' kullimkien fis-sediment. Jekk ikun meħtieġ, jistgħu jkunu analizzati kampjuni sekondarji biex ikun iddeterminat il-grad ta' omoġeneità.

DISINN TAT-TEST

17. Id-disinn tat-test jirrelata mal-għażla tal-għadd u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-testijiet, mal-għadd ta' reċipjenti għal kull konċentrazzjoni u mal-għadd ta' larvi għal kull reċipjent. Huma deskritti disinji għal stima ta' punti ta' EC, għal stima ta' NOEC u biex jitmexxa test ta' limitu.

Disinn għal analiżi b'rigressjoni

18. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC_{15}, EC_{50}) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom jingħaqdu bil-konċentrazzjonijiet inklużi fit-test. Ġeneralment, l-akkuratezza u l-aktar il-validità, li bihom ikunu jistgħu jsiru stimi ta' konċentrazzjonijiet ta' effetti (EC_x), titjieb meta l-konċentrazzjoni ta' effetti tkun fil-firxa ta' konċentrazzjonijiet ittestjati. Estrapolazzjoni ħafna taħt il-konċentrazzjoni pożittiva l-aktar baxxa jew 'il fuq mill-ogħla konċentrazzjoni għandha tkun evitata. Test preliminari biex jinstabu firxiet ikun utli biex tintgħażel il-firxa ta' konċentrazzjonijiet li jkollhom jintużaw (ara l-paragrafu 27)).

▼M4

19. Jekk għandu jkun stmat EC_x, għandhom ikunu ttestjati mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet u tliet replikati għal kull konċentrazzjoni. Huwa rrakkomandat li jintużaw konċentrazzjonijiet suffiċjenti ta' testijiet biex titħalla ssir stima tajba ta' mudell. Il-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet meta l-kurva ta' rispons għad-doża jkollha anglu baxx). L-għadd ta' replikati f'kull trattament jista' jitnaqqas jekk l-għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti jiżdied. Iż-żieda fl-għadd ta' replikati jew it-tnaqqis fit-tul tal-intervalli tal-konċentrazzjoni tat-test jittendu li jwasslu għal intervall idjaq ta' kunfidenza għat-test. Ikunu meħtieġa replikati addizzjonali jekk għandhom ikunu stmati s-sopravivenza u t-tkabbir tal-larvi għal 10-ijiem.

Disinn għal stima ta' NOEC/LOEC

20. Jekk għandhom ikunu stmati LOEC jew NOEC, għandhom jintużaw ħames konċentrazzjonijiet tat-test b'mill-anqas erba' replikati u l-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn. L-għadd ta' replikati għandu jkun suffiċjenti biex tkun żgurata qawwa adegwata ta' statistika biex tinkixef differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikat ta' 5 % (p = 0,05). Bir-rata ta' żvilupp, Analiżi ta' Varjanza (ANOVA) is-soltu tkun adatta, bħat-test Dunnett u t-test Williams (17)(18)(19)(20). Fil-proporzjon ta' evoluzzjoni jistgħu jkunu użati t-testijiet Cochran-Armitage, dak eżatt ta' Fisher (bil-korrezzjoni ta' Bonferroni), jew ta' Mantel-Haenszel.

Test ta' limitu

21. Ikun jista' jsir test ta' limitu (konċentrazzjoni ta' test wieħed u kontroll) jekk ma jkun osservat ebda effett fit-test preliminari ta' detezzjoni ta' firxa. L-għan tat-test ta' limitu huwa li jitwettaq test f'konċentrazzjoni għolja biżżejjed biex dawk li jieħdu deċiżjonijiet ikunu jistgħu jeskludu effetti tossiċi li jista' jkun hemm tas-sustanza għall-ittestjar, u l-limitu jkun stabbilit f'konċentrazzjoni li ma tkunx mistennija li tidher f'kull sitwazzjoni. Huwa rrakkomandat 1 000 mg/kg (piż fin-niexef). Is-soltu jkunu meħtieġa mill-anqas sitt replikati kemm għat-trattament kif ukoll għall-kontroll. Għandha tintwera qawwa adegwata ta' statistika biex tinkixef differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikat ta' 5 % (p = 0,05). B'rispons metriku (rata ta' żvilupp u piż), it-t-test huwa metodu ta' statistika adatt jekk dejta tissodisfa l-ħtiġijiet ta' dan it-test (normalità, varjanzi omoġenji). Jista' jintuża t-t-test ta' varjanza inugwali jew test mhux parametriku, bħat-test Wilcoxon-Mann-Whithey, jekk dawn il-ħtiġijiet ma jkunux sodisfatti. Bil-proporzjon ta' evoluzzjoni, it-test eżatt ta' Fisher ikun adatt.

PROĊEDURA

Kondizzjonijiet ta' espożizzjoni

Tħejjija ta' sistema ta' sediment u ilma ffortifikati

22. Hija rrakkomandata l-proċedura ta' fortifikazzjoni deskritta fil-Metodu ta' Ttestjar C.8: Tossiċità għal Ħniex għal applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar (14). Is-sedimenti ffortifikati jitqiegħdu fir-reċipjenti u jiżdied ilma ta' fuq biex jinġieb proporzjon ta' volum ta' sediment-ilma ta' 1:4 (ara l-paragrafi 11 u 15). Il-fond tas-saff tas-sediment għandu jkun fil-firxa ta' 1,5 - 3 cm.Biex ikunu evitati separazzjoni ta' ingredjenti tas-sediment u sospensjoni mill-ġdid ta' materjal fin matul iż-żieda ta' ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, is-sediment jista' jitgħatta b'diska tal-plastik waqt li jkun qed jitferra' ilma fiha, u d-diska titneħħa minnufih wara. Apparati oħra jistgħu wkoll ikunu adatti.

23. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu mgħottijin (eż. bi platti tal-ħġieġ). Jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju l-ilma jimtela sal-livell tal-volum oriġinali biex dan jagħmel tajjeb għall-evaporazzjoni tal-ilma. Dan għandu jsir billi jintuża ilma distillat jew dejonizzat biex ma jitħalliex jiżdied melħ.

▼M4

Stabilizzazzjoni

24. Malli jkun tħejja s-sediment iffortifikat bl-ilma ta' fuq, tkun ħaġa mixtieqa li titħalla ssir partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar mill-faži milwiema għas-sediment (3)(4)(6)(13). Preferibbilment dan għandu jsir skont il-kondizzjonijiet ta' temperatura u tirwiħ użati fit-test. Żmien xieraq ta' ekwilibrazzjoni huwa speċifiku għas-sediment u għall-kimika, u jista' jieħu minn sigħat sa jiem u f'każijiet rari sa diversi ġimgħat (4-5 ġimgħat). Minħabba li dan iħalli żmien għal degradazzjoni ta' ħafna kimiċi, ma jkunx mistenni ekwilibriju iżda huwa rrakkomandat perjodu ta' ekwilibrazzjoni ta' 48 siegħa. Fit-tmiem ta' dan il-perjodu ulterjuri ta' ekwilibrazzjoni, il-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar għandha titkejjel fl-ilma ta' fuq, fl-ilma tal-pori u fis-sediment, mill-anqas fl-ogħla konċentrazzjoni u f'waħda aktar baxxa (ara l-paragrafu 38). Dawn id-determinazzjonijiet analitiċi tas-sustanza għall-ittestjar jippermettu ssir kalkulazzjoni tal-bilanċ tal-massa u espressjoni ta' riżultati abbażi ta' konċentrazzjonijiet imkejla.

Żieda ta' organiżmi tat-test

25. Minn erba' sa ħamest ijiem qabel ma l-organiżmi tat-test jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test, għandhom jittieħdu kwantitajiet ta' bajd mill-kulturi u jitqiegħdu f'reċipjenti żgħar f'midjum ta' kulturi. Jista' jintuża midjum qadim mill-kultura ta' stokkijiet jew midjum li jkun għadu kif tħejja. Jekk jintuża dan tal-aħħar, ammont żgħir ta' ikel eż. alka ħadra u/jew ftit qatriet żgħar ta' filtrat minn sospensjoni miħuna fin ta' trofof ta' ikel tal-ħut għandu jiżdied mal-midjum tal-kultura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss kwantijiet ta' bajd miġbur frisk. Normalment, il-larvi jibdew ifaqqsu ftit jiem wara li jkun hemm il-bajd (2 sa 3 ijiem għal *Chironomus riparius* f'20 °C u 1 sa 4 ijiem għal *Chironomus tentans* fi 23 °C u *Chironomus yoshimatui* fi 25 °C) u jkun hemm tkabbir ta' larvi f'erba' fażijiet, kull faži ddum 4-8 ijiem. Fit-test għandhom jintużaw larvi tal-ewwel faži (2-3 jew 1-4 ijiem wara li jkunu faqqsu). Il-faži ta' pappamoski tista' possibbilment tkun ivverifikata billi jintuża l-wisa' tal-iskutella tar-ras (6).

26. Għoxrin larvi tal-ewwel faži jkunu allokati kif jinzertaw lil kull reċipjent tat-test li jkun fih is-sediment imħallat u l-ilma, billi tintuża pipetta mingħajr ponta. It-tirwiħ tal-ilma għandu jieqaf waqt li l-larvi jkunu qed jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test u jibqa' hekk għal 24 siegħa oħra wara li jkunu żdiedu l-larvi (ara l-paragrafi 25 u 32). Skont it-tifsila tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), l-għadd ta' larvi użati għal kull konċentrazzjoni jkun mill-anqas 60 għall-istima ta' punti ta' EC u 80 għal determinazzjoni ta' NOEC.

Konċentrazzjonijiet tat-test

27. Test ta' detezzjoni ta' firxa jista' jkun utli biex tkun iddeterminata l-firxa ta' konċentrazzjonijiet għat-test definittiv. Għal dan il-għan tintuża serje ta' konċentrazzjonijiet spazjati fil-wisa' tas-sustanza għall-ittestjar. Biex tkun ipprovduta l-istess densità tal-wiċċ għal kull kironomidu, li jkollu jintuża għat-test definittiv, kironomidi jkunu esposti għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar għal perjodu li jippermetti stima ta' konċentrazzjonijiet adatti ta' testijiet, u ma jkunx hemm ħtieġa ta' replikati.

28. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għat-test definittiv ikunu deċiżi abbażi tar-riżultat tat-test ta' detezzjoni ta' firxa. Mill-anqas għandhom jintużaw u jintgħażlu ħames konċentrazzjonijiet kif deskritt fil-paragrafi 18 sa 20.

▼M4

Kontrolli

29. Reċipjenti ta' kontroll mingħajr sustanza għall-ittestjar iżda li jkunu jinkludu sediment għandhom ikunu inklużi fit-test bl-għadd xieraq ta' replikati (ara l-paragrafi 19-20). Jekk ikun intuża solvent għal applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar (ara l-paragrafu 16), għandu jiżdied kontroll ta' solvent ta' sediment.

Sistema ta' ttestjar

30. Jintużaw sistemi statiċi. Sistemi semistatiċi jew ta' fluss kontinwu bl-ilma ta' fuq jiġġedded kull tant jew kontinwament jistgħu jintużaw f'każijiet eċċezzjonali bħal pereżempju jekk speċifikazzjonijiet tal-kwalità tal-ilma jisfaw ma jkunux adatti għall-organiżmu tat-test jew jaffettwaw l-ekwilibriju kimiku (eż. livelli ta' ossiġnu maħlul jinżlu baxxi ħafna, il-konċentrazzjoni ta' prodotti ta' ekskreta togħla żżejjed jew minerali jlissu minn sediment u jaffettwaw il-pH u/jew il-melħ minerali fl-ilma). Iżda metodi oħra biex titjieb il-kwalità tal-ilma ta' fuq, bħal tirwiħ, għandhom normalment ikunu biżżejjed u jkunu ppreferuti.

Ikel

31. Ikun meħtieġ li l-larvi jintemgħu, preferibbilment kuljum jew mill-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa. L-ikel tal-ħut (sospensjoni fl-ilma jew ikel miżjun fin, eż. TetraMin jew TetraPhyll; ara d-dettalji fl-Appendiċi 2) fl-ammont ta' 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg għal *C. yoshimatui*) għal kull larva kuljum jidher li jkun adegwat għal larvi żgħar għall-ewwel 10 ijiem. Jista' jkun meħtieġ ftit aktar ikel għal larvi li jkollhom aktar żmien: 0,5 - 1 mg għal kull larva kuljum għandu jkun suffiċjenti għall-bqija tat-test. Ir-razzjon tal-ikel għandu jitnaqqas fit-trattamenti kollha u l-kontrolli jekk ikun hemm tkabbir fungali jew jekk fil-kontrolli jkunu osservati mwiet. Jekk ma jkunx jista' jitwaqqaf żvilupp fungali t-test għandu jittenna. Meta jkunu qed jiġu ttestjati sustanzi li jassorbixxu ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5), jew sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-ammont ta' ikel meħtieġ biex ikunu żgurati sopravivenza u tkabbir naturali tal-organiżmi jista' jiżdied mas-sediment formulat qabel il-perjodu ta' stabbilizzazzjoni. Għal dan, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok ikel tal-ħut, eż. tista' tintuża żieda ta' 0,5 % (piż fin-niexef) ta' weraq miżjun fin ta' eż. ħorrieqa tnigges (*Urtica dioica*), ċawsla (*Morus alba*), silla bajda (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*) jew ta' materjal ieħor tal-pjanti (*Cerophyl* jew ċelluloża alfa).

Kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni

32. Tirwiħ bil-mod tal-ilma ta' fuq f'reċipjenti tat-test ikun ipprovdut preferibbilment 24 siegħat wara li jiżdiedu l-larvi u jitkompla matul it-test kollu (għandha tingħata attenzjoni biex il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul ma tinżilx taħt 60 % ta' ASV). Tirwiħ ikun ipprovdut permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħġieġ imwaħħla 2-3 cm 'il fuq mis-saff tas-sediment (jiġifieri bużżieqa waħda jew ftit tal-ilma/sec). Meta jkunu qed jiġu ttestjati kimiċi volatili, jista' jitqies li s-sistema tas-sediment-ilma ma titrewwaħx.

33. It-test jitmexxa f'temperatura kostanti ta' 20 °C (± 2 °C). Għal *C. tentans* u *C. yoshimatui* t-temperaturi rakkomandati jkunu ta' 23 °C u 25 °C (± 2 °C), rispettivament. Jintuża fotoperjodu ta' 16-il siegħa u l-intensità tad-dawl għandha tkun 500 sa 1 000 lux.

▼M4

Durata tal-espożizzjoni

34. L-espożizzjoni tibda biż-żieda ta' larvi fir-reċipjenti ffortifikati u ta' kontroll. Id-durata massima tal-espożizzjoni tkun ta' 28 jum għal C. riparius u C. yoshimatsui, u 65 jum għal *C. tentans*. Jekk pappamoski jevolvu qabel, it-test jista' jitwaqqaf wara minimu ta' ħamest ijiem wara li jkun evolva l-ewwel adult fil-kontroll.

Osservazzjonijiet

Emerġenza

35. Ikunu ddeterminati ż-żmien ta' żvilupp u l-għadd totali ta' pappamoski rġiel u nisa evoluti għal kollox. L-irġiel ikunu identifikati faċilment mill-antenni tagħhom kollha pjumi.

36. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu osservati mill-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa biex issir valutazzjoni viżiva ta' kull mġiba mhux normali (eż. tluq mis-sediment, għawm mhux tas-soltu), mqabbla mal-kontroll. Matul il-perjodu ta' evoluzzjoni mistennija jkun meħtieġ li jsir għadd kuljum ta' pappamoski li jkunu evolvew għalkollox. Is-sess u l-għadd ta' pappamoski evoluti għalkollox ikunu rreġistrati kuljum. Wara identifikazzjoni l-pappamoski jitneħħew mir-reċipjenti. Kull kwantità ta' bajd iddepożitata qabel ma jintemm it-test għandha tkun irreġistrata u mbagħad titneħħa biex larvi ma jitħallewx jerġgħu jidħlu fis-sediment. Ikun irreġistrat ukoll l-għadd ta' pupae viżibbli li jkunu naqsu li jevolvu. Gwida dwar kejl ta' evoluzzjoni hija pprovduta fl-Appendiċi 5.

Tkabbir u sopravivenza

37. Jekk għandha tkun ipprovduta dejta dwar sopravivenza u tkabbir ta' larvi għal 10 ijiem, għandhom ikunu inklużi reċipjenti addizzjonali tat-test mill-bidu, biex ikunu jistgħu jintużaw wara. Is-sediment minn dawn ir-reċipjenti addizzjonali jintgħarbel billi jintuża għarbiel ta' 250 μm biex iżomm il-larvi. Kriterji għal mewt huma immobbiltà jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimulu mekkaniku. Larvi li ma jkunux irkuprati għandhom jingħaddu wkoll bħala mejtin (larvi li jkunu mietu fil-bidu tat-test setgħu kienu ġew iddegradati minn mikrobi). Ikunu ddeterminat il-piż fin-niexef (mingħajr irmied) tal-larvi li jkunu baqgħu ħajjin għal kull reċipjent tat-test u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent. Ikun utli li jkun iddeterminat ta' liema fażi jkunu l-larvi li jkunu baqgħu ħajjin; għal dak jista' jintuża l-kejl tal-wisa' tal-iskutella tar-ras ta' kull larva.

Kejlijiet analitiċi

Konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar

38. Qabel ma jibda t-test (jiġifieri żieda ta' larvi), jittieħdu kampjuni tas-sediment kollu minn mill-anqas reċipjent wieħed għal kull trattament għad-determinazzjoni analitika tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fis-sediment. Huwa rrakkomandat li, bħala minimu, kampjuni tal-ilma ta' fuq, tal-ilma tal-pori u tas-sediment ikunu analizzati fil-bidu (ara l-paragrafu 24) u fit-tmiem tat-test, fl-ogħla konċentrazzjoni u f'waħda aktar baxxa. Dawn id-determinazzjonijiet ta' konċentrazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar jagħtu tagħrif dwar l-imġiba/il-partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fis-sistema ilma u sediment.

39. Meta jittieħdu kejlijiet intermedji (eż. fis-7 jum) u jekk l-analiżi jkun jeħtiġilha kampjuni kbar li ma jkunux jistgħu jittieħdu minn reċipjenti tat-test mingħajr ma tkun influwenzata s-sistema ta' ttestjar, għandhom isiru determinazzjonijiet analitiċi fuq kampjuni minn reċipjenti addizzjonali tat-test ittrattati bl-istess mod (inkluża l-preżenza ta' organiżmi tat-test) iżda mhux użati għal osservazzjonijiet bijoloġiċi.

▼M4

40. Ċentrifugazzjoni pereżempju ta' 10 000 g u 4 °C għal 30 min. hija l-proċedura rrakkomandata biex ikun iżolat ilma interstizjali. Iżda jekk is-sustanza għall-ittestjar tkun turi li filtri ma jassorbuhiex, tista' wkoll tkun aċċettabbli l-filtrazzjoni. F'xi każijiet jista' ma jkunx possibbli li jkunu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori minħabba li d-daqs tal-kampjun ikun żgħir wisq.

Parametri fiżikokimiċi

41. Il-pH u t-temperatura tat-reċipjenti tat-test għandhom jitkejlu b'mod adatt (ara l-paragrafu 10). Melħ minerali fl-ilma u ammonja għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed tat-test fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fit-tmiem tat-test.

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

42. L-għan ta' dan it-test huwa biex ikun iddeterminat l-effett tas-sustanza għall-ittestjar fuq ir-rata ta' żvilupp u fuq l-għadd totali ta' pappamoski rġiel u nisa evoluti għalkollox, jew fil-każ tal-effetti tat-test ta' 10 ijiem fuq is-sopravivenza u l-piż tal-larvi. Jekk ma jkunx hemm indikazzjonijiet ta' sensivitajiet differenti statistikament ta' sessi, riżultati dwar irġiel u nisa jkunu jistgħu jinġabru għal analiżi ta' statistika. Id-differenzi ta' sensittività bejn is-sessi jistgħu jkunu ġġudikati statistikament pereżempju b'test ta' tabella χ^2-r x 2. Sopravivenza tal-larvi u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent għandha tkun ikkalkulata wara 10 jiem meta jkun meħtieġ.

43. Konċentrazzjonijiet ta' effetti espressi u bbażati fuq piż fin-niexef huma kkalkulati preferibbilment abbażi ta' konċentrazzjonijiet ta' sediment imkejla fil-bidu tat-test (ara l-pargrafu 38).

44. Biex tkun ikkomputata stima ta' punti għall-EC_{50} jew għal kull EC_x oħra, tista' tintuża statistika għal kull reċipjent bħala replika vera. Biex ikun ikkalkulat intervall ta' kunfidenza għal kull EC_x għandha titqies il-varjabbiltà fost reċipjenti, jew għandu jintwera li din il-varjabbiltà tant tkun żgħira li tista' ma titqisx. Meta l-mudell jitqiegħed minn Least Squares, għandha tkun applikata trasformazzjoni għall-istatistika għal kull reċipjent biex titjieb l-omoġeneità ta' varjanza. Iżda, valuri EC_x għandhom ikunu kkalkulati wara li r-rispons ikun ġie ttrasformat u ttieħed lura għall-valur oriġinali.

45. Meta l-analiżi ta' statistika jkollha l-għan li tiddetermina NOEC/LOEC b'it-testjar ta' ipoteżi, il-varjabbiltà fost reċipjenti jeħtiġilha titqies, eż. b'ANOVA f'aktar stadji. Alternattivament, aktar testijiet robusti (21) jistgħu jkunu adatti f'sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ksur tas-suppożizzjonijiet tas-soltu ta' ANOVA.

Proporzjon ta' evoluzzjoni

46. Proporzjonijiet ta' evoluzzjoni huma dejta alternattiva mhux kontinwa, u jistgħu jkunu analizzati bit-test ta' Cochran-Armitage applikat b'mod devoluttiv fejn tkun mistennija doża-rispons monotonika u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-istennija. Jekk le, jistgħu jintużaw test eżatt ta' Fisher jew dak ta' Mantel-Haenszel b'valuri 'p' ta' Bonferroni-Holm aġġustati. Jekk ikun hemm evidenza ta' varjabbiltà akbar bejn replikati fl-istess konċentrazzjoni milli distribuzzjoni binomja tkun tindika (sikwit irriferuta bħala varjazzjoni "extrabinomja"), mbagħad għandhom jintużaw test robust ta' Cochran-Armitage jew dak eżatt ta' Fisher kif propost fi (21).

▼**M4**

L-għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent, ne, ikun iddeterminat u diviż bl-għadd ta' larvi introdotti, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

fejn:

ER = proporzjon ta' evoluzzjoni

n_e = għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent

n_a = għadd ta' larvi introdotti għal kull reċipjent

47. Alternattiva li hija l-aktar adatta għal daqsijiet kbar ta' kampjuni, meta jkun hemm varjanza extrabinomja, hija li l-proporzjon ta' evoluzzjoni jkun ittrattat bħala rispons kontinwu u li jintużaw proċeduri bħat-test Williams meta tkun mistennija doża-rispons monotonika u tkun konsistenti ma' din id-dejta ta' ER. It-test Dunnett ikun adatt fejn il-monotoniċità ma tapplikax. Daqs kbir ta' kampjun huwa ddefinit hawn bħala l-għadd evolut, u l-għadd mhux evolut ukoll ikun aktar minn ħamsa, abbażi ta' kull replika (reċipjent).

48. Biex ikunu applikati metodi ta' ANOVA, valuri ta' ER għandhom l-ewwel ikunu ttrasformati bit-trasformazzjoni arcsin-sqrt jew bit-trasformazzjoni Freeman-Tukey biex tinkiseb distribuzzjoni normali approssimata u biex varjanzi jsiru ugwali. Jistgħu jkunu applikati t-testijiet Cochran-Armitage, dak eżatt ta' Fisher (Bonferroni), jew it-test ta' Mantel-Haenszel meta jintużaw il-frekwenzi assoluti. It-trasformazzjoni arcsin-sqrt tkun applikata billi jittieħed l-inverse sine (sin^{-1}) tal-għerq kwadrat ta' ER.

49. Għal proporzjonijiet ta' evoluzzjoni, valuri EC_x ikunu kkalkulati billi tintuża analiżi ta' rigressjoni (jew eż. probit (22), logit, Weibull, softwer kummerċjali adatt, eċċ.). Jekk analiżi ta' rigressjoni tfalli (eż. meta jkun hemm anqas minn żewġ risponsi parzjali), jintużaw metodi mhux parametriċi oħra bħal medja mobbli jew interpolazzjoni sempliċi.

Rata ta' żvilupp

50. Il-ħin medju ta' żvilupp jirrappreżenta t-tul medju ta' żmien bejn id-dħul ta' larvi (jum 0 tat-test) u l-evoluzzjoni tal-koorti sperimentali ta' pappamoski. (Għall-kalkulazzjoni taż-żmien reali ta' żvilupp, għandha titqies l-età tal-larvi fil-waqt tad-dħul). Ir-rata ta' żvilupp hija r-reċiproka taż-żmien tal-iżvilupp (unità: 1/jum) u tirrappreżenta dik il-parti tal-iżvilupp tal-larva li sseħħ kuljum. Ir-rata ta' żvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar tossiċità ta' sediment minħabba li l-varjanza tagħha hija aktar baxxa, u hija aktar omoġenja u eqreb distribuzzjoni normali kif imqabbla ma' żmien ta' żvilupp. Għalhekk, jistgħu jintużaw proċeduri ta' test parametriku qawwija ma' rata ta' żvilupp milli ma' żmien ta' żvilupp. Għal rata ta' żvilupp bħala reazzjoni kontinwa, jistgħu jkunu stmati valuri EC_x billi tintuża analiżi ta' rigressjoni (eż. (23), (24)).

51. Għat-testijiet ta' statistika li ġejjin, l-għadd ta' pappamoski osservati f'jum ta' spezzjoni x ikunu preżunti li jkunu evolvew fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn jum x u jum x-l (l = tul tal-intervall ta' spezzjoni, is-soltu jum 1). Ir-rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent (x) tkun ikkalkulata skont:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

fejn:

$\bar{x}$: rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent

i: indiċi ta' intervall ta' spezzjoni

m: għadd massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

f_i: għadd ta' pappamoski evoluti fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e: għadd totali ta' pappamoski evoluti fit-tmiem tal-esperiment ($= \sum f_i$)

x_i: rata ta' żvilupp tal-pappamoski evoluti f'intervall i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

fejn:

day_i: jum ta' spezzjoni (jiem minħabba applikazzjoni)

l_i: tul ta' intervall ta' spezzjoni i (jiem, is-soltu jum wieħed)

Rapport tat-test

52. Ir-rapport tat-test għandu mill-anqas jipprovdi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza għall-ittestjar:

— natura fiżika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (solubilità tal-ilma, pressjoni tal-fwar, koeffiċjent tal-partizzjoni fil-ħamrija (jew fis-sediment jekk ikunu disponibbli), stabbiltà fl-ilma, eċċ.);

— dejta ta' identifikazzjoni ta' kimiċi (isem komuni, isem tal-kimika, formula strutturali, Numru tal-CAS, eċċ.) inklużi l-purezza u l-metodu għall-kwantifikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar.

Speċi tat-test:

— annimali użati għat-test: speċi, isem xjentifiku, sors ta' organiżmi u kondizzjonijiet għat-trobbija;

— informazzjoni dwar maniġġar ta' kwantitajiet ta' bajd u larvi;

— l-età tal-annimali tat-test meta jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti tat-test.

Kondizzjonijiet tat-test:

— sediment użat, jiġifieri sediment naturali jew formulat;

— għal sediment naturali, post u deskrizzjoni ta' sit ta' teħid ta' kampjuni ta' sediment, inkluża, jekk ikun possibbli, storja ta' kontaminazzjoni; karatteristiċi: pH, kontenut ta' karbonju organiku, proporzjon ta' C/N u granulumetrija (skont kif jixraq).

— tħejjija tas-sediment formulat: ingredjenti u karatteristiċi (kontenut ta' karbonju organiku, pH, rtubija, eċċ. fil-bidu tat-test);

— tħejjija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (konċentrazzjoni tal-ossiġnu, pH, konduttività, melħ minerali fl-ilma, eċċ. fil-bidu tat-test);

— fond tas-sediment u ilma ta' fuq;

— volum tal-ilma ta' fuq u tal-pori; piż ta' sediment imxarrab bi jew mingħajr ilma tal-pori;

▼M4

— reċipjenti tat-test (materjal u daqs);

— metodu ta' fortifikazzjoni ta' sediment: konċentrazzjonijiet ta' testijiet użati, għadd ta' replikati u użu ta' solvent jekk ikun hemm;

— fażi ta' ekwilibriju ta' stabbilizzazzjoni tas-sistema ta' sediment-ilma fortifikata: durata u kondizzjonijiet;

— kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni: temperatura, ċiklu ta' dawl u intensità, tirwiħ (frekwenza u intensità);

— informazzjoni dettaljata dwar għalf inkluż tip ta' ikel, tħejjija, ammont u reġim ta' għalf.

Riżultati:

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejla tat-testijiet u r-riżultati tal-analizi kollha biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fir-reċipjent tat-test;

— il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, jiġifieri pH, temperatura, ossiġnu maħlul, melħ minerali fl-ilma u ammonja;

— bdil ta' ilma evaporat tat-test, jekk ikun hemm;

— għadd ta' pappamoski evoluti rġiel u nisa għal kull reċipjent u għal kull jum;

— għadd ta' larvi li jkunu naqsu li jevolvu bħala pappamoski għal kull reċipjent;

— medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent, u għal kull fażi, skont il-każ;

— perċentwali ta' evoluzzjoni għal kull replika u konċentrazzjoni tat-test (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);

— rata medja ta' żvilupp ta' pappamoski żviluppati għalkollox għal kull replika u rata ta' trattament (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);

— stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi eż. ECx (u intervalli assoċjati ta' kunfidenza), NOEC u/jew LOEC, u l-metodi ta' statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluża kull influwenza fuq il-konklużjonijiet tar-riżultati tat-testijiet minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

LETTERATURA:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke u H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Kanada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ u Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Kanada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Kanada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Test Method C.8 of this Annex, Toxicity for Earthworms.

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a żero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a żero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Għall-fini ta'dan il-Metodu ta' Ttestjar jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sediment ifformulat jew sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku, huwa taħlita ta' materjali li jintużaw biex jimitaw l-komponenti fiżiċi ta' sediment naturali.

Ilma ta' fuq huwa l-ilma li jitqiegħed fuq sediment fir-reċipjent tat-test.

Ilma interstizjali jew ilma tal-pori huwa l-ilma li jokkupa l-ispazju bejn sediment u partiċelli tal-ħamrija.

Sediment fortifikat huwa sediment li miegħu tkun żdiedet sustanza għall-ittestjar.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 2

Rakkomandazzjonijiet għal kultura ta' *Chironomus riparius*

1. Larvi ta' *Chironomus* jistgħu jitkabbru f'dixxijiet ta' kristallizzazzjoni jew f'kontenituri akbar. Ramel fin tal-quartz jitferrex f'saff irqiq ta' madwar 5 as 10 mm fond fuq il-qiegħ tal-kontenitur. Kieselguhr (eż. Merck, Art 8117) ukoll intwera li huwa substrat adatt (saff irqaq ta' sa ftit ħafna mm ikun biżżejjed). Wara jiżdied ilma adattat għal fond ta' diversi cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jimtlew kull meta huwa meħtieġ biex jieħdu post it-telf li jirriżulta mill-evaporazzjoni, u jkun ta' repevenzjoni kontra d-dessekazzjoni. L-ilma jista' jinbidel jekk ikun meħtieġ. Għandu jkun ipprovdut tirwiħ bil-mod. Ir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi għandhom jinżammu f'gaġġa apposta li ma tħallix li l-adulti li jkunu qed jevolvu jaħarbu. Il-gaġġa għandha tkun kbira biżżejjed biex adulti evoluti ma jitħallewx jimirħu fi qtajja kbar, għax inkella tista' ma ssirx kopulazzjoni (il-minimu huwa ta' madwar 30 x 30 x 30 cm).

2. Gaġeġ għandhom jinżammu f'temperatura ambjentali jew f'kamra ambjentalment kostanti ta' 20 + 2 °C b'perjodu fotografiku ta' 16-il siegħa dawl (intensità madwar 1 000 lux), 8 sigħat dlam. Kien irrapportat li umdità tal-arja ta' anqas minn 60 % RH tista' tfixkel ir-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuża kull ilma tajjeb naturali jew sintetiku. Komunement jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit li jkun tneħħielu l-kloru u midja artifiċjali (eż. il-midjum Elendt "M4" jew "M7", ara hawn taħt). L-ilma għandu jitrewwaħ qabel ma jintuża. Jekk ikun meħtieġ, l-ilma tal-kultura jista' jiġġedded billi l-ilma użat jitferra' jew jgħaddi minn ġo sifun minn reċipjenti ta' kultura b'attenzjoni mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larvi.

Tmigħ tal-larvi

4. Larvi ta' *Chironomus* għandhom jintemgħu ikel ta' trofof tal-ħut (TetraMin®, TetraPhyll® jew marka simili oħra ta' ikel tal-ħut proprjetarju), f'bejn wieħed u ieħor 250 mg għal kull reċipjent kuljum. Dan jista' jingħata bħala trab miħun niexef jew bħala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ta' ikel ta' trofof jiżdied ma' 20 ml ta' ilma ta' dilwizzjoni u jitħallat biex jagħti taħlita omoġenja. Din it-tħejjija tista' tintema' f'rata ta' madwar 5 ml għal kull reċipjent kuljum (ixxejkja qabel ma tuża). Larvi li jkollhom aktar żmien jistgħu jirċievu aktar.

5. It-tmigħ jista' jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum ta' kultura 'jissaħħab', it-tmigħ għandu jitnaqqas. Żidiet ta' ikel għandhom ikunu mmonitorjati b'attenzjoni. Ikel mill-anqas jikkawża tluq tal-larvi lejn il-kolonna tal-ilma, u ħafna ikel jikkawża aktar attività mikrobika u konċentrazzjonijiet tal-ossiġnu mnaqqsin. Iż-żewġ kondizzjonijiet jistgħu jġibu magħhom rati ta' tkabbir imnaqqas.

6. Xi ċelluli ta' alka ħadra (eż. Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris) jistgħu wkoll jiżdiedu meta jitqiegħdu f'reċipjenti ġodda ta' kultura.

Tmigħ ta' adulti evoluti

7. Xi whud minn dawk li jagħmlu esperimenti ssuġġerew li kuxxinett tat-tajjar mgħaddas f'soluzzjoni saturata tas-sukrożju jista' jservi ta' ikel għal adulti evoluti.

▼M4

Emerġenza

8. F'20 + 2 °C adulti jibdew jevolvu mir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi wara bejn wieħed u ieħor 13 - 15-il jum. L-irġiel jintgħarfu malajr għax ikollhom antenni kollha pjumi.

Kwantitajiet ta' bajd

9. Malli l-adulti jkunu fil-gaġġa tat-trobbija, ir-reċipjenti kollha għat-tkabbir tal-larvi għandhom ikunu eżaminati tliet darbiet fil-ġimgħa għal tqegħid ta' kwantitajiet ta' bajd qisu ġelatina. Jekk ikun hemm, il-kwantitajiet ta' bajd għandhom jitneħħew b'attenzjoni. Il-bajd għandu jkun ittrasferit għal ġo dixx żgħir li jkun fih kampjun tal-ilma tat-trobbija. Kwantitajiet ta' bajd jintużaw biex jinbeda reċipjent ġdid ta' kultura (eż. 2 - 4 kwantitajiet ta' bajd/reċipjent) jew biex jintużaw għal testijiet tat-tossiċità.

10. Larvi tal-ewwel fażi għandhom ifaqqsu wara 2 - 3 ijiem.

Reċipjenti ġodda ta' kultura

11. Malli jkunu stabbiliti kulturi għandu jkun possibbli li jitqiegħed reċipjent ġdid ta' kultura tal-larvi kull ġimgħa jew anqas ta' spiss skont ħtiġijiet ta' ttestjar, billi jitneħħew ir-reċipjenti aktar qodma wara li jkunu evolvew pappamoski adulti. Bl-użu ta' din is-sistema jkun hemm provvista regolari ta' adulti b'anqas maniġġar.

Tħejjija ta' soluzzjonijiet tat-testijiet "M4" and "M7"

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midjum "M4". Il-midjum "M7" jitħejja bħala l-midjum "M4" ħlief għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom konċentrazzjonijiet ikunu erba' darbiet aktar baxxi f'"M7" milli f'"M4". Qed titħejja pubblikazzjoni dwar il-midjum "M7" (Elendt, komunikazzjoni personali). Is-soluzzjoni tat-test ma għandhiex tkun ippreparata skont Elendt u Bias (1990) għall-konċentrazzjonijiet ta' NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 u K2HPO4 mogħtija għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet stokk mhumiex adegwati.

Tħejjija tal-midjum "M7"

13. Kull soluzzjoni ta' stokkijiet (I) titħejja waħda waħda u soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II) titħejja minn dawn is-soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) (ara Tabella 1). Ħamsin ml mis-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II) u l-ammonti ta' kull soluzzjoni ta' stokkijiet ta' makronutrijenti li jidhru fit-Tabella 2 ikunu 1 litru ta' ilma dejonizzat biex jitħejja l-midjum "M7". Titħejja soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini billi jiżdiedu tliet vitamini mal-ilma dejonizzat kif indikat fit-Tabella 3, u jiżdied 0,1 ml tas-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien ta' vitamini mal-midjum "M7" finali ftit qabel ma jintuża. (Is-soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini tinħażen iffriżata f'alikwoti żgħar). Il-midjum jitrewwaħ u jkun stabbilizzat.

LETTERATURA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tabella 1

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' mikroelementi għall-midjum M4 u M7

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I)	Ammont (mg) magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): ħallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u agħmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dawn is-sustanzi huma differenti f'M4 u f'M7, kif indikat hawn taħt.
(2) Dawn is-soluzzjonijiet jitħejjew waħda waħda, mbagħad jitferrgħu flimkien u jiġu pproċessati minnufih f'awtoklav (reċipjent li jingħalaq awtomatikament).

Tabella 2

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' makronutrijenti għall-midjum M4 u M7

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' makronutrijenti miżjudin biex jitħejja midjum M4 and M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabella 3

Soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini għall-midjum M4 u M7. It-tliet soluzzjonijiet kollha ta' vitamini jingħaqdu flimkien biex jagħmlu soluzzjoni waħda ta' stokkijiet ta' vitamini.

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini miżjudin biex jitħejja midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tijamina	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

LETTERATURA

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendiċi 3

TĦEJJIJA TA' SEDIMENT FORMULAT

Kompożizzjoni tas-sediment

Il-kompożizzjoni tas-sediment formulat għandha tkun kif ġej:

Kostitwent	Karatteristiċi	% ta' sediment piż fin-niexef
Pit	Pit ta' ħażiż Sphagnum, qrib kemm jista' jkun ta' pH 5,5-6,0 mingħajr ma tibqa' tidher il-pjanta, miżħun fin (partiċelli ta' daqs ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja	4 - 5
Ramel tal-quartz	Daqs ta' ramla: > 50 % tal-partiċelli għandhom ikunu fil-firxa ta' 50-200 µm	75 - 76
Tafal tal-kawlina	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %	20
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda ta' pit u ramel	2 (± 0,5)
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$,pulverizzat, kemikament pur	0,05 - 0,1
Ilma	Konduttività ≤ 10 µS/cm	30 - 50

Tħejjija

Il-pit jitnixxef bl-arja u jintaħan fi trab fin. Titħejja sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat billi jintuża apparat ta' omoġeneizzazzjoni ta' prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni jiġi aġġustat sa 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni tiġi kkondizzjonata għal mill-anqas jumejn billi titħawwad bil-mod f'20 ± 2 °C, biex il-pH isir stabbli u jistabbilixxi komponent mikrobiku stabbli. Il-pH jerġa' jitkejjel u għandu jkun 6,0 ± 0,5. Mbagħad is-sospensjoni tal-pit titħallat mal-kostitwenti l-oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ma' ilma dejonizzat biex jinkiseb sediment omoġenju b'kontenut ta' ilma f'firxa ta' 30-50 % tal-piż fin-niexef tas-sediment. Il-pH tat-taħlita finali jerġa' jitkejjel għal darb'oħra u jiġi aġġustat għal 6,5 sa 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun meħtieġ. Jittieħdu kampjuni tas-sediment biex ikun iddeterminat il-piż fin-niexef u l-kontenut ta' karbonju organiku. Mbagħad, qabel ma jintuża fit-test tat-tossiċità tal-kironomidi, huwa rrakkomandat li s-sediment formulat ikun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taħt l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti.

Ħżin

Il-kostitwenti nixfin għat-tħejjija tas-sediment artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post niexef u frisk f'temperatura ambjentali. Is-sediment formulat (mxarrab) m'għandux jinħażen qabel ma jsir użu minnu fit-test. Għandu jintuża minnufih wara l-perjodu ta' kondizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-tħejjija tiegħu.

LETTERATURA:

Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness. Tossiċità għal Ħniex.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Appendiċi 4

Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettbbli

Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja partikulata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 µg/l
Ebusija bħala $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Kloru residwali	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforuż totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloriċi totali flimkien ma' polikloro-bifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

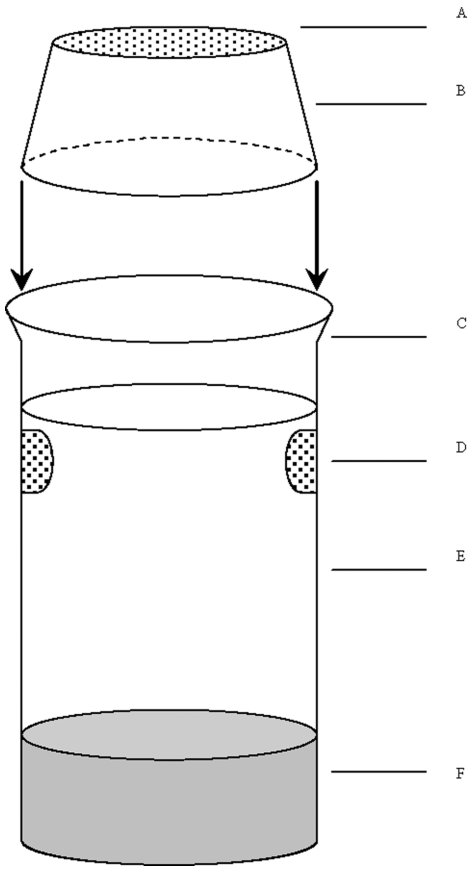
(*) Iżda għandu jkun innotat li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni).

▼**M4**

Appendiċi 5

Gwida għall-monitoraġġ tal-evoluzzjoni ta' larvi kironomidi

Sifuni ta' evoluzzjoni jitqiegħdu fuq il-bekkijiet tat-test. Dawn is-sifuni jkunu meħtieġa mill-20 jum sa meta jintemm it-test. Eżempju ta' sifun li jintuża huwa pinġut hawn taħt:



A: l-iskrijn tan-nylon

B: il-kikkri tal-plastik maqluba

C: il-bekk ta' espożizzjoni mingħajr xoffa

D: il-portijiet tal-iskrijn li jibdlu l-ilma

E: ilma

F: sediment

▼M4

C.28. TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA BL-UŻU TA' ILMA FORTIFIKAT

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għat-TG tal-OECD 219 (2004). Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex jivvaluta l-effetti ta' espożizzjoni prolongata tal-kimiċi għal-larva li tgħix fis-sediment tad-dipteran tal-ilma ħelu *Chironomus* sp. Huwa primarjament ibbażat fuq il-linja gwida BBA li tuża sistema tat-test sediment-ilma bil-ħamrija artifiċjali, u x-xenarju ta' espożizzjoni tal-kolonna tal-ilma (1). Iqis ukoll protokolli eżistenti ta' testijiet tat-tossiċità għal *Chironomus riparius* u *Chironomus tentans* li kienu żviluppati fl-Ewropa u fl-Amerika ta' Fuq (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) u kienu ring-tested (1)(6)(9). Jistgħu jintużaw ukoll speċijiet oħra ta' kironomidi iddokumentati sewwa, eż. *Chironomus yoshimatsui* (10)(11).

2. Ix-xenarju ta' espożizzjoni użat f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ta' ilma fortifikat. L-għażla tax-xenarju adatt ta' espożizzjoni tiddependi mill-applikazzjoni maħsuba tat-test. Ix-xenarju ta' espożizzjoni għall-ilma, li jinvolvi kolonna fortifikata ta' ilma, huwa maħsub li jkun jixbah sprej ta' pestiċidi meta jgħaddi mal-kurrent, u jkopri l-konċentrazzjonijiet meta fil-bidu jilħqu l-aqwa tagħhom f'ilma tal-pori. Huwa wkoll utli għal tipi oħra ta' espożizzjoni (inkluż tixrid kimiku) ħlief għal proċessi ta' akkumulazzjoni li jdumu aktar mill-perjodu tat-test.

3. Sustanzi li jeħtiġilhom ikunu ttestjati għal organiżmi li jgħixu f'sediment is-soltu jippersistu f'dan il-kompartiment tul perjodi twal ta' żmien. L-organiżmi li jgħixu f'sediment jistgħu jkunu esposti permezz ta' għadd ta' rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni u taż-żmien meħud għal kull waħda biex tikkontribwixxi għall-effetti tossiċi globali, tiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika konċernata. Għal sustanzi li jassorbixxu ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5) jew għal sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-inġestjoni ta' ikel kontaminat tista' tkun rotta sinifikanti ta' espożizzjoni. Biex it-tossiċità ta' sustanzi lipofiliċi ħafna ma tkunx sottovalutata, jista' jitqies l-użu ta' ikel miżjud mas-sediment qabel l-applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar. Biex jittieħdu r-rotot potenzjali kollha ta' espożizzjoni l-fokus ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar ikun fuq espożizzjoni fit-tul. It-testijiet idumu madwar 20 - 28 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u 28 - 65 jum għal *C. tentans*. Jekk tkun meħtieġa dejta għal żmien qasir għan speċifiku, pereżempju biex ikunu mistħarrġa l-effetti ta' kimiċi instabbli, replikati addizzjonali jistgħu jitneħħew wara perjodu ta' għaxart ijiem.

4. Il-punti ta' tmiem imkejla huma l-għadd totali ta' adulti li jkunu evolvew u ż-żmien li jkunu ħadu biex evolvew. Huwa rrakkomandat li l-kejl tas-sopravivenza u tat-tkabbir tal-larvi għandu jsir biss wara perjodu ta' għaxart ijiem jekk tkun meħtieġa dejta addizzonali għal żmien qasir, billi jintużaw replikati addizzjonali skont il-każ.

5. Huwa rrakkomandat l-użu ta' sediment formulat. Sediment formulat għandu diversi vantaġġi fuq sedimenti naturali:

— il-varjabbiltà sperimentali titnaqqas minħabba li jifforma "matriċi standardizzata" riproduċibbli u l-ħtieġa li jinstabu sorsi ta' sediment mhux kontaminati u nodfa tkun eliminata;

— it-testijiet jistgħu jibdew f'kull żmien mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà staġonali fis-sediment tat-test u ma jkunx hemm ħtieġa li s-sediment ikun ittrattat minn qabel biex titneħħa fawna indiġena; l-użu ta' sediment formulat inaqqas ukoll l-ispiża b'rabta mal-ġabra mill-post ta' ammonti suffiċjenti ta' sediment għal testijiet ta' rutina;

▼M4

— l-użu ta' sediment formulat jippermetti li jsiru tqabbiliet ta' tossiċità u gradazzjoni ta' sustanzi b'dan il-mod: dejta dwar tossiċità minn testijiet b'sediment naturali u artifiċjali kienet komparabbli għal diversi kimiċi (2).

6. Definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel fażi ta' larvi kironomidi jkunu esposti għal firxa ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'sistemi ta' sediment-ilma. It-test jibda billi l-larvi tal-ewwel fażi jitqiegħdu fil-bekkijiet tat-test li jkun fihom is-sistema ta' sediment-ilma u sussegwentement is-sustanza għall-ittestjar tiġi ffortifikata mal-ilma. Ir-rata ta' evoluzzjoni u żvilupp ta' kironomidi titkejjel fit-tmiem tat-test. Is-sopravivenza u l-piż tal-larvi jistgħu jitkejlu wkoll wara 10 ijiem jekk ikun meħtieġ (billi jintużaw replikati addizzjonali skont kif ikun xieraq). Din id-dejta tkun analizzata jew billi jintuża mudell ta' rigressjoni biex tkun stmata l-konċentrazzjoni li għandha tikkawża x % tnaqqis fl-evoluzzjoni, fis-sopravivenza jew fit-tkabbir tal-larvi (eż. EC_{15}, EC_{50}, eċċ.), jew billi jintuża ttestjar ta' ipoteżi ta' statistika biex ikun iddeterminat NOEC/LOEC. Dan tal-aħħar ikun jeħtieġlu tqabbil ta' valuri ta' effett ma' valuri ta' kontroll billi jintużaw testijiet ta' statistika.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA GĦALL-ITTESTJAR

8. Is-solubilità fl-ilma tas-sustanza għall-ittestjar, il-pressjoni tal-fwar tagħha, il-partizzjoni mkejla jew ikkalkulata f'sediment u l-istabbiltà fl-ilma u fis-sediment għandhom ikun magħrufin. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f'ilma ta' fuq, f'ilma tal-pori u f'sediment b'akkuratezza magħrufa u rrapportata u b'limitu ta' detezzjoni. Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali u l-purezza tas-sustanza għall-ittestjar. Dak li jiġrilha kimikament is-sustanza għall-ittestjar (eż. tixrid, degradazzjoni abijotika u bijotika, eċċ.) ukoll huwa informazzjoni utli. Aktar gwida għall-ittestjar ta' sustanzi bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluha diffiċli għalihom li jsirilhom it-test tingħata fi (12).

KIMIĊI TA' REFERENZA

9. Kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu ttestjati perjodikament bħala mezz li jiżgura li l-protokoll tat-test u l-kondizzjonijiet tat-test ikunu affidabbli. Eżempji ta' sustanzi tossiċi ta' referenza użati b'suċċess f'ring-tests u fi studji ta' validazzjoni huma: lindane, trifluralin, pentaklorofenol, klorur tal-kamdju u klorur tal-potassju. (1)(2)(5)(6)(13).

VALIDITÀ TAT-TEST

10. Biex it-test ikun validu japplikaw il-kondizzjonijiet li ġejjin:

— l-evoluzzjoni fil-kontrolli għandha tkun mill-anqas 70 % fit-tmiem tat-test. (1)(6);

— l-evoluzzjoni ta' *C. riparius* u *C. yoshimatsui* għal adulti minn reċipjenti ta' kontroll għandha sseħħ bejn 12 u 23 jum wara li jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti; għal *C. tentans*, ikun meħtieġ perjodu ta' 20 sa 65 jum.

— fit-tmiem tat-test, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul għandhom jitkejlu f'kull reċipjent. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu għandha tkun mill-anqas 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV) fit-temperatura użata, u l-pH tal-ilma ta' fuq għandu jkun fil-firxa ta' 6-9 fir-reċipjenti kollha tal-ittestjar;

▼M4

— it-temperatura tal-ilma mhux suppost tkun differenti b'iktar minn ± 1,0 °C. It-temperatura tal-ilma tista' tkun ikkontrollata b'kamra iżotermika u f'dak il-każ it-temperatura tal-kamra għandha tkun ikkonfermata f'intervall xierqa ta' ħin.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Reċipjenti tat-test

11. L-istudju jitmexxa f'bekkijiet tal-ħġieġ ta' 600 ml b'dijametru qies ta' 8 cm. Reċipjenti oħra jkunu tajbin, iżda għandhom jiggarantixxu fond sewwa tal-ilma ta' fuq u tas-sediment. Il-wiċċ tas-sediment għandu jkun suffiċjenti biex jipprovdi 2 sa 3 cm^2 għal kull larva. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tas-sediment mal-fond tal-ilma ta' fuq għandu jkun 1:4. Reċipjenti tat-test u apparat ieħor li jiġu f'kuntatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kollha mill-ħġieġ jew minn materjal ieħor kimikament inerti (eż. Teflon).

Għażla ta' speċi

12. L-ispeċi li għandha tintuża fit-test preferibbilment hija *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* hija adatta wkoll iżda aktar diffiċli biex tkun ittrattata u jeħtiġilha perjodu itwal ta' test. Tista' tintuża wkoll *Chironomus yohimatsui*. Dettalji ta' metodi ta' kultura jingħataw fl-Appendiċi 2 għal *Chironomus riparius*. Informazzjoni dwar kondizzjonijiet ta' kultura hija wkoll disponibbli għal speċijiet oħra, jiġifieri għal *Chironomus tentans* (4) u *Chironomus yoshimatsui* (11). L-identifikazzjoni ta' speċijiet għandha tkun ikkonfermata qabel l-ittestjar iżda ma tkunx meħtieġa qabel kull test jekk organiżmi jkunu ġejjin minn kultura interna.

Sediment

13. Preferibbilment għandu jintuża sediment formulat (msejjaħ ukoll sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Iżda, jekk jintuża sediment naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (huma wkoll irrakkomandati mill-anqas pH, kontenut ta' karbonju organiku, determinazzjoni ta' parametri oħra bħal proporzjon ta' C/N u granulometrija), u għandu jkun ħieles minn kull kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu ma', jew jikkunsmaw lill-kironomidi. Huwa wkoll irrakkomandat li, qabel ma jintuża f'test tat-tossiċità tal-kironomidi, is-sediment naturali jkun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taħt l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti. Huwa rrakkomandat li f'dan it-test jintuża s-sediment formulat li ġej, ibbażat fuq il-ħamrija artifiċjali użata fil-Metodu ta' Ttestjar C.8 (14) (1)(15)(16):

(a) 4-5 % pit (piż fin-niexef): qrib kemm jista' jkun pH 5,5 sa 6,0; huwa importanti li jintuża pit f'għamla ta' trab, miħun fin (partiċelli ta' daqs ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja biss.

(b) 20 % tafal tal-kawlina (piż fin-niexef) (kontenut ta' kawlina preferibbilment aktar minn 30 %).

(c) 75-76 % ramel tal-quartz (piż fin-niexef) (għandu jippredomina ramel fin b'aktar minn 50 % tal-partiċelli bejn 50 u 200 μm).

(d) jiżdied ilma dejonizzat biex jinkiseb kontenut ta' rtuba tat-taħlita finali f'firxa ta' 30 - 50 %.

(e) Karbonat tal-kalċju ta' kwalità kemikament pura ($CaCO_3$) jiżdied, aġġusta l-pH tat-taħlita finali tas-sediment għal 7,0 ± 0,5.

(f) Il-kontenut ta' karbonju organiku tat-taħlita finali għandu jkun 2 % (± 0,5 %) u għandu jkun aġġustat b'ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

▼M4

14. Is-sors tal-pit, tafal tal-kawlina u ramel għandha tkun magħrufa. Il-komponenti tas-sediment għandhom ikunu eżaminati għan-nuqqas ta' kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti tal-organokloru, komposti organofosforuži, eċċ.). Eżempju għat-tħejjija tas-sediment formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-taħlit ta' kostitwenti nixfin ikun ukoll aċċettabbli jekk jintwera li wara li jkun żdied l-ilma ta' fuq ma sseħħx separazzjoni tal-kostitwenti tas-sediment (eż. biċċiet tal-pit fil-wiċċ tal-ilma), u li l-pit jew is-sediment ikunu kkondizzjonati b'mod suffiċjenti.

Ilma

15. Kull ilma li jkun konformi mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma dilwit b'mod aċċettabbli kif elenkat fl-Appendiċijiet 2 u 4 ikun tajjeb bħala ilma tat-test. Kull ilma tajjeb, ilma naturali (ilma tal-wiċċ jew ta' taħt l-art), ilma rikostitwit (ara l-Appendiċi 2) jew ilma tal-vit li jkun tneħħielu l-kloru jkun aċċettabbli bħala ilma ta' kultura u ilma tat-test jekk kironomidi jibqgħu jgħixu fih sakemm idumu l-kultura u t-testjar mingħajr ma juru sinjal ta' stress. Fil-bidu tat-test, il-pH tal-ilma tat-test għandu jkun bejn 6 u 9 u t-total ta' melħ minerali fl-ilma ma jkunx ogħla minn 400 mg/l bħala $CaCO_3$. Iżda, jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni). Għandu jintuża l-istess tip ta' ilma tul l-istudju kollu. Il-karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma elenkati fl-Appendiċi 4 għandhom jitkejlu mill-anqas darbtejn fis-sena jew meta jkun hemm suspett li dawn il-karatteristiċi jkunu setgħu nbidlu b'mod sinifikanti.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet - Ilma fortifikat

16. Konċentrazzjonijiet ta' testijiet ikunu kkalkulati abbaži ta' konċentrazzjonijiet ta' kolonni ta' ilma, jiġifieri tal-ilma ta' fuq is-sediment. Soluzzjonijiet tat-testijiet tal-konċentrazzjoni magħżula s-soltu jitħejjew b'dilwizzjoni ta' soluzzjoni ta' stokkijiet. Soluzzjonijiet ta' stokkijiet għandhom preferibbilment jitħejjew billi s-sustanza għall-ittestjar tinħall fil-midjum għall-ittestjar. F'xi każijiet jista' jkun meħtieġ l-użu ta' solventi jew aġenti ta' tixrid biex tkun prodotta soluzzjoni ta' stokkijiet konċentrata b'mod adatt. Eżempji ta' solventi adatti huma aċetun, etanol, metanol, etere monoelitiku tal-glikol tal-etilen, etere tad-dimentil tal-glikol tal-etilen, formamidi tad-dimentil u glikol tat-trietilen. Aġenti ta' tixrid li jistgħu jintużaw huma Cremophor RH40, Tween 80, ċelluloża tal-metil 0,01 % u HCO-40. Il-konċentrazzjoni ta' aġent ta' solubilità fil-midjum tal-ittestjar finali għandu jkun minimali (i.e. ≤ 0.,1 ml/l) u għandu jkun l-istess fit-trattamenti kollha. Meta jintuża aġent ta' solubilità, m'għandux ikollu effetti sinifikanti fuq sopravivenza jew effett ħażin viżibbli fuq il-larvi kironomidi kif ikun żvelat minn kontroll ta' solventi biss. Iżda għandu jsir kull sforz biex l-użu ta' dawn il-materjali jkun evitat.

DISINN TAT-TEST

17. Id-disinn tat-test jirrelata mal-għażla tal-għadd u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-testijiet, mal-għadd ta' reċipjenti għal kull konċentrazzjoni u mal-għadd ta' larvi għal kull reċipjent. Huma deskritti disinji għal stima ta' punti ta' EC, għal stima ta' NOEC u biex jitmexxa test ta' limitu. L-analiżi b'rigressjoni hija ppreferuta mill-approċċ ta' ttestjar ta' ipoteżi.

Disinn għal analiżi b'rigressjoni

18. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC_{15}, EC_{50}) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom jingħaqdu bil-konċentrazzjonijiet inklużi fit-test. Ġeneralment, l-akkuratezza u l-aktar il-validità, li bihom ikunu jistgħu jsiru stimi ta' konċentrazzjonijiet ta' effetti (EC_x), titjieb meta l-konċentrazzjoni ta'

▼M4

effetti tkun fil-firxa ta' konċentrazzjonijiet ittestjati. Estrapolazzjoni ħafna taħt il-konċentrazzjoni pożittiva l-aktar baxxa jew 'il fuq mill-oġħla konċentrazzjoni għandha tkun evitata. Test preliminari biex jinstabu firxiet ikun utli biex tintgħażel il-firxa ta' konċentrazzjonijiet li jkollhom jintużaw (ara l-paragrafu 27)).

19. Jekk għandu jkun stmat EC_x, għandhom ikunu ttestjati mill-anqas ħames konċentrazzjonijiet u tliet replikati għal kull konċentrazzjoni. Fi kwalunkwe każ, huwa rrakkomandat li jintużaw konċentrazzjonijiet suffiċjenti ta' testijiet biex titħalla ssir stima tajba ta' mudell. Il-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet meta l-kurva ta' rispons għad-doża jkollha anglu baxx). L-għadd ta' replikati f'kull trattament jista' jitnaqqas jekk l-għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti jiżdied. Iż-żieda fl-għadd ta' replikati jew it-tnaqqis fit-tul tal-intervalli tal-konċentrazzjoni tat-test jittendu li jwasslu għal intervall idjaq ta' kunfidenza għat-test. Ikunu meħtieġa replikati addizzjonali jekk għandhom ikunu stmati s-sopravivenza u t-tkabbir tal-larvi għal 10-ijiem.

Disinn għal stima ta' NOEC/LOEC

20. Jekk għandhom ikunu stmati LOEC jew NOEC, għandhom jintużaw ħames konċentrazzjonijiet tat-test b'mill-anqas erba' replikati u l-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn. L-għadd ta' replikati għandu jkun suffiċjenti biex tkun żgurata qawwa adegwata ta' statistika biex tinkixef differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikat ta' 5 % (p = 0,05). Bir-rata ta' żvilupp, Analiżi ta' Varjanza (ANOVA) is-soltu tkun adatta, bħat-test Dunnett u t-test Williams (17)(18)(19)(20). Fil-proporzjon ta' evoluzzjoni jistgħu jkunu użati t-testijiet Cochran-Armitage, dak eżatt ta' Fisher (bil-korrezzjoni ta' Bonferroni), jew ta' Mantel-Haenszel.

Test ta' limitu

21. Ikun jista' jsir test ta' limitu (konċentrazzjoni ta' test wieħed u kontroll) jekk ma jkun osservat ebda effett fit-test preliminari ta' detezzjoni ta' firxa. L-għan tat-test ta' limitu huwa li jkun indikat li l-valur tossiku tas-sustanza għall-ittestjar ikun akbar mill-konċentrazzjoni ta' limitu ttestjata. F'dan il-Metodu ta' Ttestjar ma jistax isir suġġeriment għall-konċentrazzjoni rakkomandata; dan jitħalla fil-ġudizzju tar-regolatur. Is-soltu jkunu meħtieġa mill-anqas sitt replikati kemm għat-trattament kif ukoll għall-kontroll. Għandha tintwera qawwa adegwata ta' statistika biex tinkixef differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikat ta' 5 % (p = 0,05). B'rispons metriku (rata ta' żvilupp u piż), it-t-test huwa metodu ta' statistika adatt jekk dejta tissodisfa l-ħtiġijiet ta' dan it-test (normalità, varjanzi omoġenji). Jista' jintuża t-t-test ta' varjanza inugwali jew test mhux parametriku, bħat-test Wilcoxon-Mann-Whithey, jekk dawn il-ħtiġijiet ma jkunux sodisfatti. Bil-proporzjon ta' evoluzzjoni, it-test eżatt ta' Fisher ikun adatt.

PROĊEDURA

Kondizzjonijiet ta' espożizzjoni

Tħejjija ta' sistema ta' ilma u sediment fortifikati

22. Ammonti adatti ta' sediment formulat (ara l-paragrafi 13-14 u Appendiċi 3) jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test biex jifformaw saff ta' mill-anqas 1,5 cm. L-ilma jiżdied għal fond ta' 6 cm (ara paragrafu 15). Il-proporzjon tal-fond tas-saff tas-sediment u l-fond tal-ilma ma għandux jaqbeż 1:4 u s-saff tas-sediment ma għandux ikun iktar fond minn 3 cm. Is-sistema sediment-ilma għandha titħalla taħt tirwiħ ġentitli għal sebat ijiem qabel iż-żieda tal-organiżmi tat-test (ara l-paragrafu 14 u l-Appendiċi 3). Biex ikunu evitati separazzjoni ta' ingredjenti tas-sediment u sospensjoni mill-ġdid ta' materjal fin matul iż-żieda ta' ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, is-sediment jista' jitgħatta b'diska tal-plastik waqt li jkun qed jitferra' ilma fiha, u d-diska titneħħa minnufih wara. Apparati oħra jistgħu wkoll ikunu adatti.

▼M4

23. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu mgħottijin (eż. bi platti tal-ħġieġ). Jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju l-ilma jimtela sal-livell tal-volum oriġinali biex dan jagħmel tajjeb għall-evaporazzjoni tal-ilma. Dan għandu jsir billi jintuża ilma distillat jew dejonizzat biex ma jitħalliex jiżdied melħ.

Żieda ta' organiżmi tat-test

24. Minn erba' sa ħamest ijiem qabel ma l-organiżmi tat-test jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test, għandhom jittieħdu kwantitajiet ta' bajd mill-kulturi u jitqiegħdu f'reċipjenti żgħar f'midjum ta' kulturi. Jista' jintuża midjum qadim mill-kultura ta' stokkijiet jew midjum li jkun għadu kif tħejja. Jekk jintuża dan tal-aħħar, ammont żgħir ta' ikel eż. alka ħadra u/jew ftit qatriet żgħar ta' filtrat minn sospensjoni mitħuna fin ta' trofof ta' ikel tal-ħut għandu jiżdied mal-midjum tal-kultura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss kwantijiet ta' bajd miġbur frisk. Normalment, il-larvi jibdew ifaqqsu ftit jiem wara li jkun ħemm il-bajd (2 sa 3 ijiem għal *Chironomus riparius* f'20 °C u 1 sa 4 ijiem għal *Chironomus tentans* fi 23 °C u *Chironomus yoshimatui* fi 25 °C) u jkun hemm tkabbir ta' larvi f'erba' fażijiet, kull fażi ddum 4-8 ijiem. Fit-test għandhom jintużaw larvi tal-ewwel fażi (2-3 jew 1-4 ijiem wara li jkunu faqqsu). Il-fażi ta' pappamoski tista' possibbilment tkun ivverifikata billi jintuża l-wisa' tal-iskutella tar-ras (6).

25. Għoxrin larvi tal-ewwel fażi jkunu allokati kif jinzertaw lil kull reċipjent tat-test li jkun fih is-sediment imħallat u l-ilma, billi tintuża pipetta mingħajr ponta. It-tirwiħ tal-ilma għandu jieqaf waqt li l-larvi jkunu qed jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test u jibqa' hekk għal 24 siegħa oħra wara li jkunu żdiedu l-larvi (ara l-paragrafi 24 u 32). Skont it-tifsila tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), l-għadd ta' larvi użati għal kull konċentrazzjoni jkun mill-anqas 60 għall-istima ta' punti ta' EC u 80 għal determinazzjoni ta' NOEC.

26. Erbgħa u għoxrin siegħa wara li jkunu żdiedu l-larvi, is-sustanza għall-ittestjar titħallat fil-kolonna tal-ilma fuq, u jerġa' jingħata tirwiħ. Ikunu applikati volumi żgħar ta' soluzzjonijiet ta' sustanzi għall-ittestjar taħt il-wiċċ tal-ilma billi tintuża pipetta. L-ilma ta' fuq għandu mbagħad jitħallat b'attenzjoni biex is-sediment ma jitħarbatx.

Konċentrazzjonijiet tat-test

27. Test ta' detezzjoni ta' firxa jista' jkun utli biex tkun iddeterminata l-firxa ta' konċentrazzjonijiet għat-test definittiv. Għal dan il-għan tintuża serje ta' konċentrazzjonijiet spazjati fil-wisa' tas-sustanza għall-ittestjar. Biex tkun ipprovduta l-istess densità tal-wiċċ għal kull kironomidu, li jkollu jintuża għat-test definittiv, kironomidi jkunu esposti għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar għal perjodu li jippermetti stima ta' konċentrazzjonijiet adatti ta' testijiet, u ma jkunx hemm ħtieġa ta' replikati.

28. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għat-test definittiv ikunu deċiżi abbażi tar-riżultat tat-test ta' detezzjoni ta' firxa. Mill-anqas għandhom jintużaw u jintgħażlu ħames konċentrazzjonijiet kif deskritt fil-paragrafi 18 sa 20.

Kontrolli

29. Reċipjenti ta' kontroll mingħajr sustanza għall-ittestjar iżda li jkunu jinkludu sediment għandhom ikunu inklużi fit-test bl-għadd xieraq ta' replikati (ara l-paragrafi 19-20). Jekk ikun intuża solvent għal applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar (ara l-paragrafu 16), għandu jiżdied kontroll ta' solvent ta' sediment.

▼M4

Sistema ta' ttestjar

30. Jintużaw sistemi statiċi. Sistemi semistatiċi jew ta' fluss kontinwu bl-ilma ta' fuq jiġġedded kull tant jew kontinwament jistgħu jintużaw f'każijiet eċċezzjonali bħal pereżempju jekk speċifikazzjonijiet tal-kwalità tal-ilma jisfaw ma jkunux adatti għall-organiżmu tat-test jew jaffettwaw l-ekwilibriju kimiku (eż. livelli ta' ossiġnu maħlul jinżlu baxxi ħafna, il-konċentrazzjoni ta' prodotti ta' ekskreta togħla żżejjed jew minerali jlissu minn sediment u jaffettwaw il-pH u/jew il-melħ minerali fl-ilma). Iżda metodi oħra biex titjieb il-kwalità tal-ilma ta' fuq, bħal tirwiħ, għandhom normalment ikunu biżżejjed u jkunu ppreferuti.

Ikel

31. Ikun meħtieġ li l-larvi jintemgħu, preferibbilment kuljum jew mill-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa. L-ikel tal-ħut (sospensjoni fl-ilma jew ikel miħun fin, eż. Tetra-Min jew Tetra-Phyll; ara d-dettalji fl-Appendiċi 2) fl-ammont ta' 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg għal *C. yoshimatui*) għal kull larva kuljum jidher li jkun adegwat għal larvi żgħar għall-ewwel 10 ijiem. Jista' jkun meħtieġ ftit aktar ikel għal larvi li jkollhom aktar żmien: 0,5 -1 mg għal kull larva kuljum għandu jkun suffiċjenti għall-bqija tat-test. Ir-razzjon tal-ikel għandu jitnaqqas fit-trattamenti kollha u jkun ikkontrollat jekk ikun hemm tkabbir fungali jew jekk fil-kontrolli jkunu osservati mwiet. Jekk ma jkunx jista' jitwaqqaf żvilupp fungali t-test għandu jittenna. Meta jkunu qed jiġu ttestjati sustanzi li jassorbixxu ħafna (eż. b'log K_{ow} > 5), jew sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-ammont ta' ikel meħtieġ biex ikunu żgurati sopravivenza u tkabbir naturali tal-organiżmi jista' jiżdied mas-sediment formulat qabel il-perjodu ta' stabbilizzazzjoni. Għal dan, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok ikel tal-ħut, eż. tista' tintuża żieda ta' 0,5 % (piż fin-niexef) ta' weraq miħunn fin ta' eż. ħorrieqa tnigges (*Urtica dioica*), ċawsla (*Morus alba*), silla bajda (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*) jew ta' materjal ieħor tal-pjanti (*Cerophyl* jew ċelluloża alfa).

Kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni

32. Tirwiħ bil-mod tal-ilma ta' fuq f'reċipjenti tat-test ikun ipprovdut preferibbilment 24 siegħat wara li jiżdiedu l-larvi u jitkompla matul it-test kollu (għandha tingħata attenzjoni biex il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu maħlul ma tinżilx taħt 60 % ta' ASV). Tirwiħ ikun ipprovdut permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħġieġ imwaħħla 2-3 cm 'il fuq mis-saff tas-sediment (jiġifieri bużżieqa waħda jew ftit tal-ilma/sec). Meta jkunu qed jiġu ttestjati kimiċi volatili, jista' jitqies li s-sistema tas-sediment-ilma ma titrewwaħx.

33. It-test jitmexxa f'temperatura kostanti ta' 20 °C (± 2 °C). Għal *C. tentans* u *C. yoshimatui* t-temperaturi rakkomandati huma ta' 23 °C u 25 °C (± 2 °C), rispettivament. Jintuża fotoperjodu ta' 16-il siegħa u l-intensità tad-dawl għandha tkun 500 sa 1 000 lux.

Durata tal-espożizzjoni

34. L-espożizzjoni tibda biż-żieda ta' larvi fir-reċipjenti ffortifikati u ta' kontroll. Id-durata massima tal-espożizzjoni tkun ta' 28 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u 65 jum għal *C. tentans*. Jekk pappamoski jevolvu qabel, it-test jista' jitwaqqaf wara minimu ta' ħamest ijiem wara li jkun evolva l-ewwel adult fil-kontroll.

OSSERVAZZJONIJIET

Emerġenza

35. Ikunu ddeterminati ż-żmien ta' żvilupp u l-għadd totali ta' pappamoski rġiel u nisa evoluti għalkollox. L-irġiel ikunu identifikati faċilment mill-antenni tagħhom kollha pjumi.

▼M4

36. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu osservati mill-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa biex issir valutazzjoni viżiva ta' kull mġiba mhux normali (eż. tluq mis-sediment, għawm mhux tas-soltu), mqabbla mal-kontroll. Matul il-perjodu ta' evoluzzjoni mistennija jkun meħtieġ li jsir għadd kuljum ta' pappamoski li jkunu evolvew għalkollox. Is-sess u l-għadd ta' pappamoski evoluti għalkollox ikunu rreġistrati kuljum. Wara identifikazzjoni l-pappamoski jitneħħew mir-reċipjenti. Kull kwantità ta' bajd iddepożitata qabel ma jintemm it-test għandha tkun irreġistrata u mbagħad titneħħa biex larvi ma jitħallewx jerġgħu jidħlu fis-sediment. Ikun irreġistrat ukoll l-għadd ta' pupae viżibbli li jkunu naqsu li jevolvu. Gwida dwar kejl ta' evoluzzjoni hija pprovduta fl-Appendiċi 5.

Tkabbir u sopravivenza

37. Jekk għandha tkun ipprovduta dejta dwar sopravivenza u tkabbir ta' larvi għal 10 ijiem, għandhom ikunu inklużi reċipjenti addizzjonali tat-test mill-bidu, biex ikunu jistgħu jintużaw wara. Is-sediment minn dawn ir-reċipjenti addizzjonali jintgħarbel billi jintuża għarbiel ta' 250 μm biex iżomm il-larvi. Kriterji għal mewt huma immobbiltà jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimulu mekkaniku. Larvi li ma jkunux irkuprati għandhom jingħaddu wkoll bħala mejtin (larvi li jkunu mietu fil-bidu tat-test setgħu kienu ġew iddegradati minn mikrobi). Ikunu ddeterminat il-piż fin-niexef (mingħajr irmied) tal-larvi li jkunu baqgħu ħajjin għal kull reċipjent tat-test u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent. Ikun utli li jkun iddeterminat ta' liema fażi jkunu l-larvi li jkunu baqgħu ħajjin; għal dak jista' jintuża l-kejl tal-wisa' tal-iskutella tar-ras ta' kull larva.

Kejlijiet analitiċi

Konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar

38. Bħala minimu, kampjuni tal-ilma ta' fuq, tal-ilma tal-pori u tas-sediment għandhom ikunu analizzati fil-bidu (preferibbilment sieġħa wara applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar) u fit-tmiem tat-test, fl-ogħla konċentrazzjoni u f'waħda aktar baxxa. Dawn id-determinazzjonijiet ta' konċentrazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar jagħtu tagħrif dwar l-imġiba/il-partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fis-sistema ilma u sediment. Teħid ta' kampjuni ta' sediment fil-bidu tat-test jista' jinfluwenza s-sistema ta' ttestjar (eż. tneħħija ta' larvi tat-test), għalhekk għandhom jintużaw reċipjenti addizzjonali tat-test biex jitwettqu determinazzjonijiet analitiċi fil-bidu u matul it-test jekk ikun jixraq (ara l-paragrafu 39). Kejlijiet fis-sediment jistgħu ma jkunx meħtieġ jekk il-partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar bejn ilma u sediment tkun ġiet iddeterminata b'mod ċar fi studju dwar ilma/sediment f'kondizzjonijiet komparabbli (eż. proporzjon ta' sediment ma' ilma, tip ta' applikazzjoni, kontenut ta' karbonju organiku ta' sediment).

39. Meta jittieħdu kejlijiet intermedji (eż. fis-7 jum) u jekk l-analiżi jkun jeħtiġilha kampjuni kbar li ma jkunux jistgħu jittieħdu minn reċipjenti tat-test mingħajr ma tkun influwenzata s-sistema ta' ttestjar, għandhom isiru determinazzjonijiet analitiċi fuq kampjuni minn reċipjenti addizzjonali tat-test ittrattati bl-istess mod (inkluża l-preżenza ta' organiżmi tat-test) iżda mhux użati għal osservazzjonijiet bijoloġiċi.

40. Ċentrifugazzjoni pereżempju ta' 10 000 g u 4ºC għal 30 min. hija l-proċedura rrakkomandata biex ikun iżolat ilma interstizjali. Iżda jekk is-sustanza għall-ittestjar tkun turi li filtri ma jassorbuhiex, tista' wkoll tkun aċċettabbli l-filtrazzjoni. F'xi każijiet jista' ma jkunx possibbli li jkunu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori minħabba li d-daqs tal-kampjun ikun żgħir wisq.

▼M4

Parametri fiżikokimiċi

41. Il-pH, ossiġnu maħlul fl-ilma tat-test u t-temperatura tat-reċipjenti tat-test għandhom jitkejlu b'mod adatt (ara l-paragrafu 10). Melħ minerali fl-ilma u ammonja għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed tat-test fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fit-tmiem tat-test.

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

42. L-għan ta' dan it-test huwa biex ikun iddeterminat l-effett tas-sustanza għall-ittestjar fuq ir-rata ta' żvilupp u fuq l-għadd totali ta' pappamoski rġiel u nisa evoluti għalkollox, jew fil-każ tal-effetti tat-test ta' 10 ijiem fuq is-sopravivenza u l-piż tal-larvi. Jekk ma jkunx hemm indikazzjonijiet ta' sensitivitajiet differenti statistikament ta' sessi, riżultati dwar irġiel u nisa jkunu jistgħu jinġabru għal analiżi ta' statistika. Id-differenzi ta' sensittività bejn is-sessi jistgħu jkunu ġġudikati statistikament pereżempju b'test ta' tabella χ^2-r x 2. Sopravivenza tal-larvi u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent għandha tkun ikkalkulata wara 10 jiem meta jkun meħtieġ.

43. Konċentrazzjonijiet ta' effetti espressi bħala konċentrazzjonijiet fl-ilma ta' fuq huma kkalkulati preferibbilment abbażi ta' konċentrazzjonijiet imkejla fil-bidu tat-test (ara l-paragrafu 38).

44. Biex tkun ikkomputata stima ta' punti għall-EC_{50} jew għal kull EC_x oħra, tista' tintuża statistika għal kull reċipjent bħala replika vera. Biex ikun ikkalkulat intervall ta' kunfidenza għal kull EC_x għandha titqies il-varjabbiltà fost reċipjenti, jew għandu jintwera li din il-varjabbiltà tant tkun żgħira li tista' ma titqisx. Meta l-mudell jitqiegħed minn Least Squares, għandha tkun applikata trasformazzjoni għall-istatistika għal kull reċipjent biex titjieb l-omoġeneità ta' varjanza. Iżda, valuri EC_x għandhom ikunu kkalkulati wara li r-rispons ikun ġie ttrasformat u ttieħed lura għall-valur oriġinali.

45. Meta l-analiżi ta' statistika jkollha l-għan li tiddetermina NOEC/LOEC b'it-testjar ta' ipoteżi, il-varjabbiltà fost reċipjenti jeħtiġilha titqies, eż. b'ANOVA f'aktar stadji. Alternattivament, aktar testijiet robusti (21) jistgħu jkunu adatti f'sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ksur tas-suppożizzjonijiet tas-soltu ta' ANOVA.

Proporzjon ta' evoluzzjoni

46. Proporzjonijiet ta' evoluzzjoni huma dejta alternattiva mhux kontinwa, u jistgħu jkunu analizzati bit-test ta' Cochran-Armitage applikat b'mod devoluttiv fejn tkun mistennija doża-rispons monotonika u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-istennija. Jekk le, jistgħu jintużaw test eżatt ta' Fisher jew dak ta' Mantel-Haenszel b'valuri 'p' ta' Bonferroni-Holm aġġustati. Jekk ikun hemm evidenza ta' varjabbiltà akbar bejn replikati fl-istess konċentrazzjoni milli distribuzzjoni binomja tkun tindika (sikwit irriferuta bħala varjazzjoni "extrabinomja"), mbagħad għandhom jintużaw test robust ta' Cochran-Armitage jew dak eżatt ta' Fisher kif propost fi (21).

47. L-għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent, ne, ikun iddeterminat u diviż bl-għadd ta' larvi introdotti, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

fejn:

ER = proporzjon ta' evoluzzjoni

n_e = għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent

n_a = għadd ta' larvi introdotti għal kull reċipjent

48. Alternattiva li hija l-aktar adatta għal daqsijiet kbar ta' kampjuni, meta jkun hemm varjanza extrabinomja, hija li l-proporzjon ta' evoluzzjoni jkun ittrattat bħala rispons kontinwu u li jintużaw proċeduri bħat-test Williams meta tkun mistennija doża-rispons monotonika u tkun konsistenti ma' din id-dejta ta' ER. It-test Dunnett ikun adatt fejn il-monotoniċità ma tapplikax. Daqs kbir ta' kampjun huwa ddefinit hawn bħala l-għadd evolut, u l-għadd mhux evolut ukoll ikun aktar minn ħamsa, abbażi ta' kull replika (reċipjent).

49. Biex ikunu applikati metodi ta' ANOVA, valuri ta' ER għandhom l-ewwel ikunu ttrasformati bit-trasformazzjoni arcsin-sqrt jew bit-trasformazzjoni Freeman-Tukey biex tinkiseb distribuzzjoni normali approssimata u biex varjanzi jsiru ugwali. Jistgħu jkunu applikati t-testijiet Cochran-Armitage, dak eżatt ta' Fisher (Bonferroni), jew it-test ta' Mantel-Haenszel meta jintużaw il-frekwenzi assoluti. It-trasformazzjoni arcsin-sqrt tkun applikata billi jittieħed l-inverse sine (sin-1) tal-għerq kwadrat ta' ER.

50. Għal proporzjonijiet ta' evoluzzjoni, valuri EC_x ikunu kkalkulati billi tintuża analiżi ta' rigressjoni (jew eż. probit (22), logit, Weibull, softwer kummerċjali adatt, eċċ.). Jekk analiżi ta' rigressjoni tfalli (eż. meta jkun hemm anqas minn żewġ risponsi parzjali), jintużaw metodi mhux parametriċi oħra bħal medja mobbli jew interpolazzjoni sempliċi.

Rata ta' żvilupp

51. Il-ħin medju ta' żvilupp jirrappreżenta t-tul medju ta' żmien bejn id-dħul ta' larvi (jum 0 tat-test) u l-evoluzzjoni tal-koorti sperimentali ta' pappamoski. (Għall-kalkulazzjoni taż-żmien reali ta' żvilupp, għandha titqies l-età tal-larvi fil-waqt tad-dħul). Ir-rata ta' żvilupp hija r-reċiproka taż-żmien tal-iżvilupp (unità: 1/jum) u tirrappreżenta dik il-parti tal-iżvilupp tal-larva li sseħħ kuljum. Ir-rata ta' żvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar tossiċità ta' sediment minħabba li l-varjanza tagħha hija aktar baxxa, u hija aktar omoġenja u eqreb distribuzzjoni normali kif imqabbla ma' żmien ta' żvilupp. Għalhekk, jistgħu jintużaw proċeduri ta' test parametriku qawwija ma' rata ta' żvilupp milli ma' żmien ta' żvilupp. Għal rata ta' żvilupp bħala reazzjoni kontinwa, jistgħu jkunu stmati valuri EC_x billi tintuża analiżi ta' rigressjoni (eż. (23), (24)).

52. Għat-testijiet ta' statistika li ġejjin, l-għadd ta' pappamoski osservati f'jum ta' spezzjoni x ikunu preżunti li jkunu evolvew fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn jum x u jum x-l (l = tul tal-intervall ta' spezzjoni, is-soltu jum 1). Ir-rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent (x) tkun ikkalkulata skont:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

fejn:

$\bar{x}$: rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent

i: indiċi ta' intervall ta' spezzjoni

m: għadd massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

▼M4

f_i: għadd ta' pappamoski evoluti fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e: għadd totali ta' pappamoski evoluti fit-tmiem tal-esperiment (= $\sum f_i$)

x_i: rata ta' żvilupp tal-pappamoski evoluti f'intervall i

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

fejn:

day_i: jum ta' spezzjoni (jiem minħabba applikazzjoni)

l_i: tul ta' intervall ta' spezzjoni i (jiem, is-soltu jum wieħed)

Rapport tat-test

53. Ir-rapport tat-test għandu mill-anqas jipprovdi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza għall-ittestjar:

— natura fiżika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (solubilità tal-ilma, pressjoni tal-fwar, koeffiċjent tal-partizzjoni fil-ħamrija (jew fis-sediment jekk ikunu disponibbli), stabbiltà fl-ilma, eċċ.);

— dejta ta' identifikazzjoni ta' kimiċi (isem komuni, isem tal-kimika, formula strutturali, Numru tal-CAS, eċċ.) inklużi l-purezza u l-metodu għall-kwantifikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar.

Speċi tat-test:

— annimali użati għat-test: speċi, isem xjentifiku, sors ta' organiżmi u kondizzjonijiet għat-trobbija;

— informazzjoni dwar maniġġar ta' kwantitajiet ta' bajd u larvi;

— l-età tal-annimali tat-test meta jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti tat-test.

Kondizzjonijiet tat-test:

— sediment użat, jiġifieri sediment naturali jew formulat;

— għal sediment naturali, post u deskrizzjoni ta' sit ta' teħid ta' kampjuni ta' sediment, inkluża, jekk ikun possibbli, storja ta' kontaminazzjoni; karatteristiċi: pH, kontenut ta' karbonju organiku, proporzjon ta' C/N u granulometrija (skont kif jixraq).

— tħejjija tas-sediment formulat: ingredjenti u karatteristiċi (kontenut ta' karbonju organiku, pH, rtubija, eċċ. fil-bidu tat-test);

— tħejjija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (konċentrazzjoni tal-ossiġnu, pH, konduttività, melħ minerali fl-ilma, eċċ. fil-bidu tat-test);

— fond tas-sediment u ilma ta' fuq;

— volum tal-ilma ta' fuq u tal-pori; piż ta' sediment imxarrab bi jew mingħajr ilma tal-pori;

— reċipjenti tat-test (materjal u daqs);

— metodu ta' tħejjija ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet u konċentrazzjonijiet ta' testijiet;

▼M4

— applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar: konċentrazzjonijiet ta' testijiet użati, għadd ta' replikati u użu ta' solvent jekk ikun hemm;

— kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni: temperatura, ċiklu ta' dawl u intensità, tirwiħ (frekwenza u intensità);

— informazzjoni dettaljata dwar għalf inkluż tip ta' ikel, tħejjija, ammont u reġim ta' għalf.

Riżultati:

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejla tat-testijiet u r-riżultati tal-analizi kollha biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fir-reċipjent tat-test;

— il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, jiġifieri pH, temperatura, ossiġnu maħlul, melħ minerali fl-ilma u ammonja;

— bdil ta' ilma evaporat tat-test, jekk ikun hemm;

— għadd ta' pappamoski evoluti rġiel u nisa għal kull reċipjent u għal kull jum;

— għadd ta' larvi li jkunu naqsu li jevolvu bħala pappamoski għal kull reċipjent;

— medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent, u għal kull fażi, skont il-każ;

— perċentwali ta' evoluzzjoni għal kull replika u konċentrazzjoni tat-test (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);

— rata medja ta' żvilupp ta' pappamoski żviluppati għalkollox għal kull replika u rata ta' trattament (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);

— stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi eż. CEx (u intervalli assoċjati ta' kunfidenza), NOEC u/jew LOEC u l-metodi ta' statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom;

— diskussjoni tar-riżultati, inkluża kull influwenza fuq il-konklużjonijiet tar-riżultati tat-testijiet minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

LETTERATURA:

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Kanada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼**M4**

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Kanada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Kanada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità għal Ħniex,

(15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a żero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a żero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Għall-fini ta'dan il-metodu jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sediment ifformulat jew sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku, huwa taħlita ta' materjali li jintużaw biex jimitaw l-komponenti fiżiċi ta' sediment naturali.

Ilma ta' fuq huwa l-ilma li jitqiegħed fuq sediment fir-reċipjent tat-test.

Ilma interstizjali jew ilma tal-pori huwa l-ilma li jokkupa l-ispazju bejn sediment u partiċelli tal-ħamrija.

Ilma fortifikat huwa l-ilma tat-test li miegħu tkun ġiet miżjuda s-sustanza għall-ittestjar.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 2

Rakkomandazzjonijiet għal kultura ta' *Chironomus riparius*

1. Larvi ta' *Chironomus* jistgħu jitkabbru f'dixxijiet ta' kristallizzazzjoni jew f'kontenituri akbar. Ramel fin tal-quartz jitferrex f'saff irqiq ta' madwar 5 as 10 mm fond fuq il-qiegħ tal-kontenitur. Kieselguhr (eż. Merck, Art 8117) ukoll intwera li huwa substrat adatt (saff irqaq ta' sa ftit ħafna mm ikun biżżejjed). Wara jiżdied ilma adattat għal fond ta' diversi cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jimtlew kull meta huwa meħtieġ biex jieħdu post it-telf li jirriżulta mill-evaporazzjoni, u jkun ta' repevenzjoni kontra d-dessekazzjoni. L-ilma jista' jinbidel jekk ikun meħtieġ. Għandu jkun ipprovdut tirwiħ bil-mod. Ir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi għandhom jinżammu f'gaġġa apposta li ma tħallix li l-adulti li jkunu qed jevolvu jaħarbu. Il-gaġġa għandha tkun kbira biżżejjed biex adulti evoluti ma jitħallewx jimirħu fi qtajja kbar, għax inkella tista' ma ssirx kopulazzjoni (il-minimu huwa ta' madwar 30 x 30 x 30 cm).

2. Gaġeġ għandhom jinżammu f'temperatura ambjentali jew f'kamra ambjentalment kostanti ta' 20 + 2 °C b'perjodu fotografiku ta' 16-il siegħa dawl (intensità madwar 1 000 lux), 8 sigħat dlam. Kien irrapportat li umdità tal-arja ta' anqas minn 60 % RH tista' tfixkel ir-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuża kull ilma tajjeb naturali jew sintetiku. Komunement jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit li jkun tneħħielu l-kloru u midja artifiċjali (eż. il-midjum Elendt "M4" jew "M7", ara hawn taħt). L-ilma għandu jitrewwaħ qabel ma jintuża. Jekk ikun meħtieġ, l-ilma tal-kultura jista' jiġġedded billi l-ilma użat jitferra' jew jgħaddi minn ġo sifun minn reċipjenti ta' kultura b'attenzjoni mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larvi.

Tmigħ tal-larvi

4. Larvi ta' *Chironomus* għandhom jintemgħu ikel ta' trofof tal-ħut (Tetra Min®, Tetra Phyll® jew marka simili oħra ta' ikel tal-ħut proprjetarju), f'bejn wieħed u ieħor 250 mg għal kull reċipjent kuljum. Dan jista' jingħata bħala trab miħun niexef jew bħala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ta' ikel ta' trofof jiżdied ma' 20 ml ta' ilma ta' dilwizzjoni u jitħallat biex jagħti taħlita omoġenja. Din it-tħejjija tista' tintema' f'rata ta' madwar 5 ml għal kull reċipjent kuljum (ixxejkja qabel ma tuża). Larvi li jkollhom aktar żmien jistgħu jirċievu aktar.

5. It-tmigħ jista' jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum ta' kultura 'jissaħħab', it-tmigħ għandu jitnaqqas. Żidiet ta' ikel għandhom ikunu mmonitorjati b'attenzjoni. Ikel mill-anqas jikkawża tluq tal-larvi lejn il-kolonna tal-ilma, u ħafna ikel jikkawża aktar attività mikrobika u konċentrazzjonijiet tal-ossiġnu mnaqqsin. Iż-żewġ kondizzjonijiet jistgħu jġibu magħhom rati ta' tkabbir imnaqqas.

6. Xi ċelluli ta' alka ħadra (eż. Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris) jistgħu wkoll jiżdiedu meta jitqiegħdu f'reċipjenti ġodda ta' kultura.

Tmigħ ta' adulti evoluti

7. Xi whud minn dawk li jagħmlu esperimenti ssuġġerew li kuxxinett tat-tajjar mgħaddas f'soluzzjoni saturata tas-sukrożju jista' jservi ta' ikel għal adulti evoluti.

▼M4

Emerġenza

8. F'20 + 2 °C adulti jibdew jevolvu mir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi wara bejn wieħed u ieħor 13 - 15-il jum. L-irġiel jintgħarfu malajr għax ikollhom antenni kollha pjumi.

Kwantitajiet ta' bajd

9. Malli l-adulti jkunu fil-gaġġa tat-trobbija, ir-reċipjenti kollha għat-tkabbir tal-larvi għandhom ikunu eżaminati tliet darbiet fil-ġimgħa għal tqegħid ta' kwantitajiet ta' bajd qisu ġelatina. Jekk ikun hemm, il-kwantitajiet ta' bajd għandhom jitneħħew b'attenzjoni. Il-bajd għandu jkun ittrasferit għal ġo dixx żgħir li jkun fih kampjun tal-ilma tat-trobbija. Kwantitajiet ta' bajd jintużaw biex jinbeda reċipjent ġdid ta' kultura (eż. 2 - 4 kwantitajiet ta' bajd/reċipjent) jew biex jintużaw għal testijiet tat-tossiċità.

10. Larvi tal-ewwel fażi għandhom ifaqqsu wara 2 - 3 ijiem.

Reċipjenti ġodda ta' kultura

11. Malli jkunu stabbiliti kulturi għandu jkun possibbli li jitqiegħed reċipjent ġdid ta' kultura tal-larvi kull ġimgħa jew anqas ta' spiss skont ħtiġijiet ta' ttestjar, billi jitneħħew ir-reċipjenti aktar qodma wara li jkunu evolvew pappamoski adulti. Bl-użu ta' din is-sistema jkun hemm provvista regolari ta' adulti b'anqas maniġġar.

Tħejjija ta' soluzzjonijiet tat-testijiet "M4" u "M7"

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midjum "M4". Il-midjum "M7" jitħejja bħala l-midjum "M4" ħlief għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom konċentrazzjonijiet ikunu erba' darbiet aktar baxxi f'"M7" milli f'"M4". Qed titħejja pubblikazzjoni dwar il-midjum "M7" (Elendt, komunikazzjoni personali). Is-soluzzjoni tat-test ma għandhiex tkun ippreparata skont Elendt u Bias (1990) għall-konċentrazzjonijiet ta' NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 u K2HPO4 mogħtija għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet stokk mhumiex adegwati.

Tħejjija tal-midjum "M7"

13. Each soluzzjoni ta' stokkijiet (I) titħejja waħda waħda u soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II) titħejja minn dawn is-soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) (ara Tabella 1). 50 ml mis-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II) u l-ammonti ta' kull soluzzjoni ta' stokkijiet ta' makronutrijenti li jidhru fit-Tabella 2 huma magħmulin minn sa 1 l ta' ilma dejonizzat biex jitħejja l-midjum "M7". Titħejja soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini billi jiżdiedu tliet vitamini mal-ilma dejonizzat kif indikat fit-Tabella 3, u jiżdied 0,1 ml tas-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien ta' vitamini mal-midjum "M7" finali ftit qabel ma jintuża. (Is-soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini tinħażen iffriżata f'alikwoti żgħar). Il-midjum jitrewwaħ u jkun stabbilizzat.

Tabella 1

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' mikroelementi għall-midjum M4 u M7

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I)	Ammont (mg) magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): ħallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u agħmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I)	Ammont (mg) magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat	Biex tħejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): ħallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u agħmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dawn is-sustanzi huma differenti f'M4 u f'M7, kif indikat hawn taħt.
(2) Dawn is-soluzzjonijiet jitħejjew waħda waħda, mbagħad jitferrgħu flimkien u jiġu pproċessati minnufih f'awtoklav (reċipjent li jingħalaq awtomatikament).

Tabella 2

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' makronutrijenti għall-midjum M4 u M7

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' makronutrijenti miżjudin biex jitħejja midjum M4 and M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabella 3

Soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini għall-midjum M4 u M7

It-tliet soluzzjonijiet kollha ta' vitamini jingħaqdu flimkien biex jagħmlu soluzzjoni waħda ta' stokkijiet ta' vitamini.

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini miżjudin biex jitħejja midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tijamina	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

LETTERATURA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

Appendiċi 3

THEJJIJA TA' SEDIMENT FORMULAT

Kompożizzjoni tas-sediment

Il-kompożizzjoni tas-sediment formulat għandha tkun kif ġej:

Kostitwent	Karatteristiċi	% ta' sediment piż fin-niexef
Pit	Pit ta' ħażiż Sphagnum, qrib kemm jista' jkun ta' pH 5,5-6,0 mingħajr ma tibqa' tidher il-pjanta, miżħun fin (partiċelli ta' daqs ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja	4-5
Ramel tal-quartz	Daqs ta' ramla: > 50 % tal-partiċelli għandhom ikunu fil-firxa ta' 50-200 µm	75-76
Tafal tal-kawlina	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %	20
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda ta' pit u ramel	2 (±0,5)
Karbonat tal-kalċju	$CaCO_3$,pulverizzat, kemikament pur	0,05 - 0,1
Ilma	Konduttività ≤ 10 µS/cm	30 - 50

Tħejjija

Il-pit jitnixxef bl-arja u jintaħan fi trab fin. Titħejja sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat billi jintuża apparat ta' omoġeneizzazzjoni ta' prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni jiġi aġġustat sa 5,5 ± 0,5 b'$CaCO_3$. Is-sospensjoni tiġi kkondizzjonata għal mill-anqas jumejn billi titħawwad bil-mod f'20 ± 2 °C, biex il-pH isir stabbli u jistabbilixxi komponent mikrobiku stabbli. Il-pH jerġa' jitkejjel u għandu jkun 6,0 ± 0,5. Mbagħad is-sospensjoni tal-pit titħallat mal-kostitwenti l-oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ma' ilma dejonizzat biex jinkiseb sediment omoġenju b'kontenut ta' ilma f'firxa ta' 30-50 % tal-piż fin-niexef tas-sediment. Il-pH tat-taħlita finali jerġa' jitkejjel għal darb'oħra u jiġi aġġustat għal 6,5 sa 7,5 b'$CaCO_3$ jekk ikun meħtieġ. Jittieħdu kampjuni tas-sediment biex ikun iddeterminat il-piż fin-niexef u l-kontenut ta' karbonju organiku. Mbagħad, qabel ma jintuża fit-test tat-tossiċità tal-kironomidi, huwa rrakkomandat li s-sediment formulat ikun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taħt l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti.

Użin

Il-kostitwenti nixfin għat-tħejjija tas-sediment artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post niexef u frisk f'temperatura ambjentali. Is-sediment formulat (mxarrab) m'għandux jinħażen qabel ma jsir użu minnu fit-test. Għandu jintuża minnufih wara l-perjodu ta' kondizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-tħejjija tiegħu.

LETTERATURA:

Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness. Tossiċità għal Ħniex.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Appendiċi 4

Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettbbli

Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja partikulata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 µg/l
Ebusija bħala $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Kloru residwali	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforuż totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloriċi totali flimkien ma' polikloro-bifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

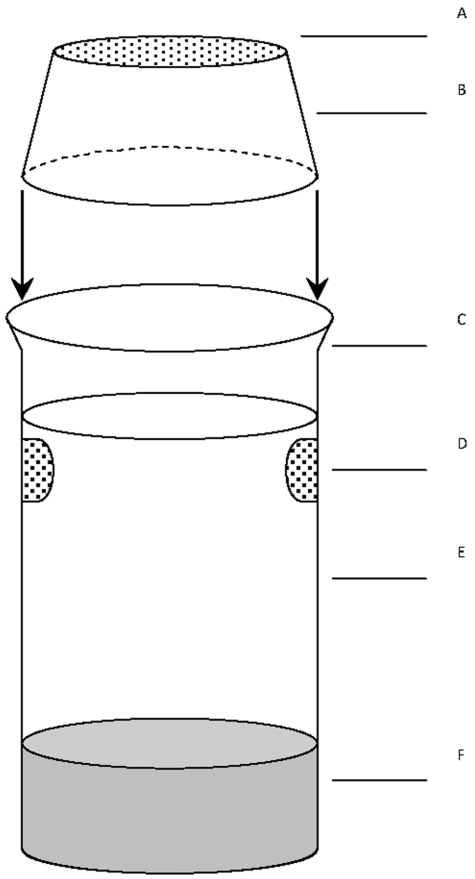
(*) Iżda għandu jkun innotat li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni).

▼**M4**

Appendiċi 5

Gwida għall-monitoraġġ tal-evoluzzjoni ta' larvi kironomidi

Sifuni ta' evoluzzjoni jitqiegħdu fuq il-bekkijiet tat-test. Dawn is-sifuni jkunu meħtieġa mill-20 jum sa meta jintemm it-test. Eżempju ta' sifun li jintuża huwa pinġut hawn taħt:



A: l-iskrijn tan-nylon

B: il-kikkri tal-plastik maqluba

C: il-bekk ta' espożizzjoni mingħajr xoffa

D: il-portijiet tal-iskrijn li jibdlu l-ilma

E: ilma

F: sediment

▼M4

C.29. BIJODEGRADABBILTÀ FAĊLI - CO_2 F'REĊIPJENTI SSIĠILLATI (TEST TA' SPAZJU FUQ)

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 310 (2006) tal-OECD. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa metodu ta' tgħarbil għall-evalwazzjoni tal-bijodegradabbiltà faċli ta' kimiċi u jipprovdi informazzjoni simili għas-sitt metodi ta' ttestjar deskritti fil-kapitolu C.4 ta' dan l-Anness A sa F. Għalhekk kimika li turi riżultati pożittivi f'dan il-Metodu ta' Ttestjar tista' titqies bijodegradabbli faċilment fl-ambjent.

2. Il-metodu stabbilit sewwa tad-dijossidu tal-karbonju (CO_2) (1), ibbażat fuq it-test oriġinali ta' Sturm (2) għall-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà ta' kimiċi organiċi, bil-kejl tad-diossidu tal-karbonju prodott minn azzjoni mikrobika, normalment kien l-ewwel għażla għall-ittestjar ta' kimiċi li ftit jinħallu u ta' dawk li jassorbu ħafna. Il-metodu jintgħażel ukoll għal kimiċi li jinħallu (iżda li mhumiex volatili), minħabba li l-evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju titqies minn ħafna li hija l-unika prova inekwivoka ta' attività mikrobika. It-tneħħija ta' karbonju organiku maħlul tista' ssir bi proċessi fiżikokimiċi - sorbiment, volatilizzazzjoni, preċipitazzjoni, idroliżi - kif ukoll b'azzjoni mikrobika, u ħafna reazzjonijiet mhux bijoloġiċi jikkunsmaw ossiġnu; CO_2 rarament ikun prodott minn kimiċi organiċi b'mod abijotiku. Fit-test oriġinali u modifikat ta' Sturm (1)(2) CO_2 jitneħħa mill-fażi likwida għal ġor-reċipjenti ta' assorbiment b'tixrix (jiġifieri arja kollha bżieżaq ittrattata biex tneħħi CO_2 permezz tal-midjum likwidu), filwaqt li fil-verżjoni ta' Larson (3)(4) CO_2 jiġi ttrasferit mir-reċipjent ta' reazzjoni għal ġor-reċipjenti ta' assorbiment billi l-arja mingħajr CO_2 tgħaddi mill-Ispazju Fuq u, addizzjonalment, ir-reċipjent tat-test jiġi xxejkjat kontinwament. Fil-modifika ta' Larson biss ir-reċipjent ta' reazzjoni jiġi xxejkjat; it-taħwid huwa speċifikat biss għal sustanzi li ma jinħallux f'ISO 9439 (5) u fil-verżjoni oriġinali tal-US (6), li t-tnejn li huma jispeċifikaw it-tixrix milli l-bdil tal-Ispazju Fuq. F'metodu uffiċjali ieħor ta' EPA tal-US (7) ibbażat fuq il-metodu ta' Gledhill (8), ir-reċipjent ta' reazzjoni xxejkjat jingħalaq għall-atmosfera u CO_2 prodott jinġabar f'sifun tal-aklalina direttament mill-fażi gassuża, bħal fi fliexken klassiċi ta' respiromiter ta' Warburg/Barcroft.

3. Iżda karbonju inorganiku (IC) intwera li jakkumula fil-midjum matul l-applikazzjoni tat-test Sturm standard, modifikat għal għadd ta' kimiċi (9). Kienet instabet konċentrazzjoni ta' IC għolja daqs 8 mg/l matul id-degradazzjoni ta' 20 mg C/l ta' anilina. Għalhekk il-ġbir ta' CO_2 fis-sifuni tal-aklalina ma kienx jirrifletti verament l-ammont ta' CO_2 prodott mikrobijoloġikament f'ħinijiet intermedji matul id-degradazzjoni. Minħabba dan, l-ispeċifikazzjoni li > 60 % tal-produzzjoni ta' CO_2 massimu teoretiku ($ThCO_2$) għandha tinġabar f'"perjodu ta' 10-d" (l-10 ijiem li jiġu minnufih wara li tinkiseb 10 % ta' bijodegradazzjoni) biex kimika għall-ittestjar tkun ikklassifikat bħala li tiddegrada malajr bijoloġikament, ma titħarisx għal xi kimiċi li jkunu ħekk ikklassifikati bl-użu tat-tneħħija ta' karbonju organiku maħlul (DOC).

4. Meta l-perċentwali ta' degradazzjoni tkun valur aktar baxx milli mistenni, IC ikun possibbilment akkumulat fis-soluzzjoni tat-test. Mbagħad id-degradabbiltà tista' tkun ivvalutata mat-testijiet l-oħra lesti tal-bijodegradabbiltà.

▼M4

5. Żvantaġġi oħra tal-metodoloġija Sturm (goffa, tieħu ż-żmien, aktar suxxettibbli għal żbalji sperimentali u mhix applikabbli għal kimiċi volatili) aktar qabel kienu ġiegħlu li ssir tfittxija għal teknika ta' reċipjent issiġillat, barra dak ta' Gledhill, aktarx milli fluss ta' gass kontinwu (10)(11). Boatman et al (12) eżaminaw mill-ġdid il-metodi ta' qabel u adottaw sistema ta' Spazju Fuq magħluq li biha CO_2 tħalla joħroġ fl-Ispazju Fuq fit-tmiem ta' inkubazzjoni b'aċidifikazzjoni tal-midjum. CO_2 tkejjel b'analiżi tal-kromatografija tal-gass (GC)/IC f'kampjuni meħudin awtomatikament tal-Ispazju Fuq iżda ma tqisx il-karbonju inorganiku maħlul (DIC) fil-faži likwida. Ir-reċipjenti użati wkoll kienu żgħar ħafna (20 ml) u kienu jesgħu biss 10 ml ta' midjum, li ħolqu problemi eż. meta jiżdiedu l-ammonti bilfors żgħar ħafna ta' kimiċi għall-ittestjar li ma jinħallux, u/jew meta jista' ma jkunx hemm mikroorganiżmi biżżejjed jew ebda minnhom fil-midjum imlaqqam li jkunu jistgħu jiddegradaw kimiċi għall-ittestjar.

6. Dawn id-diffikultajiet intgħielbu mill-istudji indipendenti ta' Struijs u Stoltenkamp (13) u ta' Birch u Fleccher (14), dawn tal-aħħar kienu ispirati mill-esperjenza tagħhom ma' apparat użat fit-test anaerobiku ta' bijodegradazzjoni (15). Fl-ewwel metodu (13) CO_2 jitkejjel fl-Ispazju Fuq wara aċidifikazzjoni u ekwilibrazzjoni, filwaqt li f'tal-aħħar (14) DIC kemm fil-faži gassuża kif ukoll f'dik likwida tkejjel mingħajr trattament; aktar minn 90 % ta' IC ifformat kien jinsab fil-faži likwida. Iż-żewġ metodi kellhom vantaġġi fuq it-test Sturm għaliex is-sistema ta' ttestjar kienet aktar kompatta u mmaniġġabbli, kimiċi volatili jistgħu jiġu ttestjati u tkun evitata l-possibbiltà ta' dewmien biex jitkejjel CO_2 prodott.

7. Iż-żewġ approċċi ngħaqdu f'CO_2 Standard tal-ISO fl-Ispazju Fuq (16), li għadda mir-ringtest (17) u huwa dan l-Istandard li jifforma l-bażi ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar. Bl-istess mod, iż-żewġ approċċi kienu użati fl-EPA tal-US (18). Kienu rrakkomandati żewġ metodi ta' kejl ta' CO_2, jiġifieri CO_2 fl-Ispazju Fuq wara aċidifikazzjoni (13) u ta' IC fil-faži likwida wara ż-żieda ta' alkali żejda. Dan l-aħħar metodu kien introdott minn Peterson matul ir-ring test CONCAWE (19) ta' dan il-Metodu ta' Spazju Fuq modifikat biex ikejjel il-bijodegradabbiltà inerenti. Il-bidliet magħmulin fir-reviżjoni tal-1992 (20) tal-metodi fil-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness għal Bijodegradabbiltà Faċli kienu inkorporati f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, biex il-kondizzjonijiet (midjum, durata, eċċ.) ikunu xort'oħra l-istess bħal dawk fit-test Sturm rivedut (20). Birch u Fletcher (14) urew li kienu nkisbu riżultati jixxiebħu ħafna b'dan it-test ta' Spazju Fuq bħalma kienu nkisbu bl-istess kimiċi fir-Ring Test tal-OECD (21) tal-Metodi ta' Ttestjar riveduti.

PRINĊIPJU TAT-TEST

8. Il-kimika għall-ittestjar, normalment f'20 mg C/l, bħala s-sors waħdani ta' karbonju u enerġija, tkun inkubata f'midjum ta' lqugħ ta' melħ minerali li jkun tlaqqam bi kwantità mħallta ta' mikroorganiżmi. It-test isir fi fliexken issiġillati bi Spazju Fuq ta' arja li jipprovdi riżerva ta' ossiġnu għal bijodegradazzjoni aerobika. L-evoluzzjoni ta' CO_2 li tiġi mill-bijodegradazzjoni aerobika finali tal-kimika għall-ittestjar tkun iddeterminata bil-kejl ta' IC prodott fil-fliexken tat-test iżjed minn dak prodott f'reċipjenti in bjank li jkun fihom biss midjum imlaqqam. Kemm ikun hemm bijodegradazzjoni jkun espress bħala perċentwali tal-produzzjoni ta' IC massimu teoretiku (ThIC), ibbażat fuq il-kwantità ta' kimika għall-ittestjar (bħala karbonju organiku) miżjud fil-bidu.

9. Tista' wkoll titkejjel it-tneħħija ta' DOC u/jew kemm ikun hemm bijodegradazzjoni primarja tal-kimika għall-ittestjar (20).

▼M4

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GĦALL-ITTESTJAR

10. Il-kontenut ta' karbonju organiku (% w/w) tal-kimika għall-ittestjar jeħtieġlu jkun magħruf, mill-istruttura kimika tiegħu jew mill-kejl, biex tkun ikkalkulata d-degradazzjoni. Għal kimiċi volatili ta' ttestjar, il-kostant imkejjel jew ikkalkulat tal-liġi ta' Henry jkun utli biex ikun iddeterminat proporzjon adatt ta' Spazju Fuq ma' volum ta' likwidu. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganiżmi tkun utli fl-għażla ta' konċentrazzjoni adatta tat-test u għall-interpretazzjoni ta' riżultati li juru bijodegradabbiltà fqira: huwa rrakkomandat li jkun inkluż il-kontroll tal-inibizzjoni sakemm ma jkunx magħruf li l-kimika għall-ittestjar ma tkunx inibitorja għal attivitajiet mikrobiċi (ara l-paragrafu 24).

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU

11. It-test ikun applikabbli għal kimiċi għall-ittestjar li ma jinħallux, għalkemm għandu jkun żgurat tixrid sewwa tal-kimika għall-ittestjar. Bl-użu tal-proporzjon rakkomandat ta' Spazju Fuq ma' volum ta' likwidu ta' 1:2, jistgħu jkunu ttestjati kimiċi volatili bil-kostant tal-liġi ta' Henry ta' sa 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ minħabba li l-proporzjon ta' kimika għall-ittestjar fl-Ispazju Fuq ma jkunx aktar minn 1 % (13). Jista' jintuża volum iżgħar ta' Spazju Fuq meta jkunu ttestjati kimiċi, li jkunu aktar volatili, iżda d-disponibbiltà bijoloġika tista' tillimita l-aktar jekk dawn ikunu ftit jinħallu fl-ilma. Iżda dawk li jużawh għandhom jiżguraw li l-proporzjon tal-Ispazju Fuq ma' volum ta' likwidu u l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ikunu hekk li jkun hemm ossiġnu biżżejjed biex titħalla ssir bijodegradazzjoni aerobika sħiħa (eż. evita li tuża konċentrazzjoni għolja ta' substrat u volum żgħir ta' Spazju Fuq). Gwida dwar dan tinsab fi (13)(23).

KIMIĊI TA' REFERENZA

12. Biex tkun eżaminata l-proċedura tat-test, għandha tkun ittestjata kimika ta' referenza ta' bijodegradabbiltà magħrufa b'mod parallel. Għal dan il-għan jistgħu jintużaw anilina, benżoat tas-sodju jew glikol tal-etilen meta jkunu ttestjati kimiċi għall-ittestjar li jinħallu fl-ilma u ottanol-1 għal kimiċi għall-ittestjar li ftit jinħallu (13). Il-bijodegradazzjoni ta' dawn il-kimiċi għandha tilħaq > 60 % ThIC fi żmien 14-il jum.

RIPRODUĊIBBILTÀ

13. Fir-ring test tal-ISO tal-metodu (17), ir-riżultati li ġejjin inkisbu bl-użu tal-kondizzjonijiet irrakkomandati, inkluż test C ta' kimika/1 ta' 20 mg.

Kimika għall-ittestjar	Perċentwali medju ta' bijodegradazzjoni (28d)	Koeffiċjent ta' varjazzjoni (%)	Għadd ta' Laboratorji
Anilina	90	16	17
Ottanol-1	85	12	14

Il-varjabbiltà (replikabbiltà) fit-test, bl-użu tal-anilina, kienet baxxa b'koeffiċjenti ta' varjabbiltà mhux akbar minn 5 % f'kull test li sar. Fiż-żewġ każijiet li fihom ir-replikabbiltà kienet agħar, il-varjabbiltà akbar aktarx kienet dovuta minħabba produzzjoni għolja ta' IC fl-in bjanki. Ir-replikabbiltà kienet agħar b'ottanol-1 iżda kienet għadha anqas minn 10 % għal 79 % ta' testijiet li saru. Din il-varjabbiltà akbar fit-test setgħet kienet dovuta minħabba żbalji fid-dożar, minħabba li kellu jkun injettat volum żgħir (3 sa 4 µl) ta' ottanol-1 fi fliexken tat-test issiġillati. Koeffiċjenti ogħla tal-varjazzjoni jirriżultaw meta jintużaw konċentrazzjonijiet iktar baxxi tal-kimika għall-ittestjar, speċjalment f'konċentrazzjonijiet li huma inqas minn 10 mg C/l. Dan jista' jingħeleb parzjalment billi titnaqqas il-konċentrazzjoni tal-karbonju inorganiku totali (TIC) fit-tilqima.

▼M4

14. F'ring-test tal-UE (24) ta' ħames tensjoattivi miżjudin f'10 mg C/l, nkisbu r-riżultati li ġejjin:

Kimika għall-ittestjar	Perċentwali medju ta' bijodegradazzjoni (28d)	Koeffiċjent ta' varjazzjoni (%)	Għadd ta' laboratorji
Tetrapropilin Sulfonat tal-benżen	17	45	10
Suċċinat ta' di-iso-ottil sulfoniku (anjoniku)	72	22	9
Klorur tal-ammonja eżadeċil-trimetil (*) (katjoniku)	75	13	10
Iso-Nonilfenol -(etossilat)$_9$ (mhux joniku)	41	32	10
Sulfobetaina tal-Kako-amid-propil tal-idrossi tad-dimetil (amfoterika)	60	23	11

(*) Kien miżjud SiO_2 biex jinnewtralizza t-tossiċità.

Ir-riżultati juru li ġeneralment il-varjabbiltà kienet ogħla għall-aġenti tensjoattivi anqas iddegradati sewwa. Varjabbiltà fit-test kienet anqas minn 15 % għal aktar minn 90 % tal-każijiet, bl-ogħla tilħaq 30-40 %.

NOTA: Kważi l-aġenti tensjoattivi kollha mhumiex speċi molekulari waħda iżda huma taħlitiet ta' isomeri, omologi, eċċ. li jiddegradaw wara perjodi differenti ta' intervalli karatteristiċi u b'rati kinetiċi differenti li jirriżultaw f'kurvi "mċajprin", estenwati, biex is-60 % tal-valur ta' pass ma jintlaħaqx "fil-perjodu ta' 10-d", anki jekk kull speċi molekulari għaliha waħidha tilħaq > 60 % fi żmien 10 jiem jekk tkun ittestjata waħidha. Dan jista' jkun osservat ukoll f'taħlitiet oħra kumplessi.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

15. Apparat normali tal-laboratorju u:

(a) Fliexken tas-serum tal-ħġieġ, issiġillati b'tappijiet tal-lastku tal-butil u siġilli tal-aluminju li jeħel. Id-daqs rakkomandat huwa 125 ml li jkollu volum totali ta' madwar 160 ml (f'dan il-każ il-volum ta' kull flixkum għandu jkun magħruf li huwa 160 ± 1 ml). Reċipjent ta' daqs iżgħar jista' jintuża meta r-riżultati jħarsu l-kondizzjonijiet deskritti fil-paragrafu 66 u 67;

(b) Analizzatur tal-karbonju jew strument ieħor (eż. kromatografu tal-gass) għall-kejl ta' karbonju inorganiku;

▼M4

(c) Siringi ta’ preċiżjoni kbira għal kampjuni gassużi u likwidi;

(d) Xejker orbitali f’ambjent ikkontrollat bit-temperatura;

(e) Provvista ta’ arja mingħajr CO_2 – din tista’ titħejja billi l-għarja tgħaddi minn granijiet tal-ġir tas-soda jew billi tintuża taħlita ta’ gass ta’ 80 % N_2/20 % 0_2 (fakultattiv) (ara l-paragrafu 28);

(f) Apparat ta’ filtrazzjoni b’membrani ta’ porożità ta’ 0,20 – 0,45 μm porożità (fakultattiv);

(g) Analizzatur ta’ karbonju organiku (fakultattiv).

Reaġenti

16. Użа reaġenti ta’ grad analitiku għal kollox.

Ilma

17. Għandu jintuża ilma distillat jew dejonizzat li jkun fih ≤1 mg/l bħala karbonju organiku totali. Dan jirrappreżenta ≤ 5 % tal-kontenut ta’ karbonju organiku tal-bidu introdott bid-doża rakkomandata tal-kimika għall-ittestjar.

Soluzzjonijiet ta’ stokkijiet għall-midjum ta’ melħ minerali

18. Is-soluzzjonijiet ta’ stokkijiet u l-midjum ta’ melħ minerali huma simili għal dawk ta’ ISO 14593 (16) u C.4 testijiet ta’ “bijodegradabbiltà faċli” (20). L-użu ta’ konċentrazzjoni għolja ta’ klorur tal-ammonju (2,0 g/l minflok 0,5 g/l) għandu jkun neċessarju biss f’każijiet verament eċċezzjonali, eż. meta l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar hija > 40 mg C/l. Soluzzjonijiet ta’ stokkijiet għandhom ikunu maħżuna fi friġġ u jintremew wara sitt xhur, jew qabel jekk ikun hemm evidenza ta’ preċipitazzjoni jew tkabbir mikrobiku. Ħejji dawn is-soluzzjonijiet ta’ stokkijiet li ġejjin:

(a) Fosfat anidru tal-idroġenu tal-potassju (KH_2PO_4) 8,50 g

Fosfat tal-idroġenu tad-dipotassju (K_2HPO_4), 21,75 g

Fosfat diidrat tal-idroġenu tad-disodju ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Klorur tal-ammonju (NH_4Cl) 0,50 g

Ħoll fl-ilma u ġib 1 litru. Il-pH ta’ din is-soluzzjoni għandu jkun 7,4 (± 0,2). Jekk dan ma jkunx il-każ, allura ħejji soluzzjoni ġdida.

(b) Klorur tal-kalċju diidrat ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; 36,40 g

Ħoll fl-ilma u ġib 1 litru.

(c) Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Ħoll fl-ilma u ġib 1 litru.

(d) Eksaidrat tal-klorur tal-ħadid (III) ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Ħoll fl-ilma u ġib 1 litru u żid qatra waħda ta’ HCl konċentrat.

Tħejjija ta’ midjum minerali

19. Ħallat 10 ml ta’ soluzzjoni (a) ma’ bejn wieħed u ieħor 800 ml ilma (paragrafu 17), mbagħad żid 1 ml ta’ soluzzjonijiet (b), (c) u (d) u ġib 1 litru bl-ilma (paragrafu 17).

Reaġenti oħra

20. Aċidu ortofosforiku konċentrat (H3PO4) (> 85 % massa għal kull volum).

▼M4

Soluzzjoni 7M ta' idrossidu tas-sodju

21. Ħoll 280 g ta' idrossidu tas-sodju (NaOH) f'1 litru ta' ilma (paragrafu 17). Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' DIC ta' din is-soluzzjoni u qis dan il-valur meta tikkalkula r-riżultat tat-test (ara l-paragrafi 55 u 61), l-aktar fid-dawl tal-kriterju tal-validità fil-paragrafu 66 (b). Ħejji soluzzjoni ġdida jekk il-konċentrazzjoni ta' DIC tkun għolja żżejjed.

Kimika għall-ittestjar:

22. Ħejji soluzzjoni ta' stokkijiet ta' kimika għall-ittestjar li tinħall biżżejjed fl-ilma (paragrafu 17) jew fil-midjum tal-ittestjar (paragrafu 19) f'konċentrazzjoni preferibbilment ta' 100 darba akbar mill-konċentrazzjoni finali li jkollha tintuża fit-test; jista' jkun meħtieġ li jkun aġġustat pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Is-soluzzjoni ta' stokkijiet għandha tiżdied mal-midjum minerali biex tagħti konċentrazzjoni ta' karbonju organiku finali ta' bejn 2 u 40 mg C/l, preferibbilment 20 mg C/l. Jekk jintużaw konċentrazzjonijiet iktar baxxi minn dawn, il-preċiżjoni miskuba tista' ma tkunx tajba. Kimiċi likwidi li jinħallu u li ma jinħallux jistgħu jiżdiedu fir-reċipjenti billi jintużaw direttament siringi ta' preċiżjoni kbira. Kimiċi għall-ittestjar li ftit jinħallu u li ma jinħallux jista' jkun jeħtiġilhom trattament speċjali (25). L-għażliet huma:

(a) żieda diretta ta' ammonti miżuna magħrufa;

(b) tixrid ultrasoniku qabel żieda;

(c) tixrid bl-għajnuna ta' aġenti emulsjonanti li jkunu meħtieġa biex ikun stabbilit jekk ikollhomx xi effetti inibitorji jew stimulatorji fuq attività mikrobika qabel iż-żieda;

(d) sorbiment ta' kimiċi likwidi tat-test, jew soluzzjoni f'solvent volatili adatt, għal fuq midjum jew sostenn inerti (eż. filtru tal-fibra tal-ħġieġ), segwiti minn evaporazzjoni tas-solvent, jekk jintuża, u żieda diretta ta' ammonti magħrufin;

(e) żieda ta' volum magħruf ta' soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'solvent faċilment volatili f'reċipjent tat-test vojt, segwita mill-evaporazzjoni tas-solvent.

Aġenti jew solventi użati f'(c), (d) u (e) għandhom ikunu ttestjati għal kull effett stimulatorju jew inibitorju fuq attività mikrobika (ara l-paragrafu 42(b)).

Kimiċi ta' referenza

23. Ħejji soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika ta' referenza (li tinħall) fl-ilma (paragrafu 17) f'konċentrazzjoni preferibbilment 100 darba akbar mill-konċentrazzjoni final li jkollha tintuża (20 mg C/l) fit-test.

Verifika ta' inibizzjoni

24. Kimiċi għall-ittestjar sikwit ma juru ebda degradazzjoni sinifikanti taħt il-kondizzjonijiet użati f'valutazzjonijiet ta' bijodegradazzjoni faċli. Kawża waħda possibbli hija li l-kimika għall-ittestjar tkun inibitorja għat-tilqima fil-konċentrazzjoni li fiha tkun applikata fit-test. Verifika ta' inibizzjoni tista' tkun inkluża fit-tifsila tat-test biex titħaffef l-identifikazzjoni (retrospettivament) ta' inibizzjoni bħala kawża possibbli jew fattur kontributorju. Alternattivament, il-verifika ta' inibizzjoni tista' teskludi interferenzi bħal dawn u turi li ebda jew ftit degradazzjoni tkun attribwibbli biss għall-fatt li ma tkunx soġġetta għal attakk mikrobiku taħt il-kondizzjonijiet tat-test. Biex tinkiseb informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganiżmi (aerobiċi), ħejji soluzzjoni fil-midjum tal-ittestjar li jkun fiha l-kimika għall-ittestjar u l-kimika ta' referenza (paragrafu 19), kull waħda fl-istess konċentrazzjonijiet kif miżjuda, rispettivament (ara l-pargrafi 22 u 23).

▼M4

Tilqima

25. It-tilqima tista' tkun ġejja minn varjetà ta' sorsi: ħama attivat; effluwent tad-dranaġġ (mhux bil-kloru); ilmijiet tal-wiċċ u ħamrija; jew minn taħlita ta' dawn (20). L-attività bijodegradattiva tas-sors għandha tkun ivverifikata billi tintuża kimika ta' referenza. Ikun xi jkun is-sors, mikroorganiżmi li qabel kienu esposti għall-kimika għall-ittestjar m'għandhomx jintużaw jekk il-proċedura jkollha tintuża bħala test għal bijodegradabbiltà faċli.

Twissija: Ħama attivat, dranaġġ u effluwent tad-dranaġġ li jkun fih organiżmi patoġeniċi u għandhom ikunu ttrattati b'kawtela.

26. Ibbażat fuq esperjenza, l-aħjar volum għat-tilqima huwa dak li:

— ikun suffiċjenti biex jirrendi attività bijodegradattiva adegwata;

— jiddegrada l-kimika ta' referenza bil-perċentwali stipulat (ara l-paragrafu 66);

— jagħti 10^2 sa 10^5 unitajiet ta' formazzjoni ta' kolonji għal kull millilitru fit-taħlita finali;

— normalment jagħti konċentrazzjoni ta' 4 mg/l ta' solidi sospiżi fit-taħlita finali meta jintuża ħama attivat; jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet sa 30 mg/l iżda jistgħu jżidu b'mod sinifikanti l-produzzjoni ta' CO_2 tal-in bjanki (26);

— jikkontribwixxi anqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni inizjali ta' karbonju organiku introdott mil-kimika għall-ittestjar;

— ikun ġeneralment 1-10 ml ta' tilqima għal 1 litru tas-soluzzjoni tat-test.

Ħama attivat

27. Ħama attivat jingabar frisk mit-tank ta' tirwiħ ta' impjant ta' trattament tad-dranaġġ jew minn unità ta' skala ta' laboratorju li tittratta l-aktar dranaġġ domestiku. Jekk ikun meħtieġ, partiċelli raffi għandhom jitneħħew billi jintgħarblu (eż. billi jintuża għarbiel b'xibka ta' 1 mm^2) u l-ħama għandu jinżamm aerobiku sakemm jintuża.

28. Alternattivament, wara tneħħija ta' kull partikola raffa, ħalli l-ħama joqgħod jew iċċentrifugah (eż. 1 100 x g għal 10 minuti). Warrab il-likwidu supernatant. Il-ħama jista' jinħasel fis-soluzzjoni minerali. Issospendi l-ħama konċentrat f'midjum minerali biex jirrendi konċentrazzjoni ta' 3-5 g solidi sospiżi/l.

29. Ħama għandu jittieħed minn impjant ta' trattament konvenzjonali li jaħdem sewwa. Jekk ħama jkollu jittieħed minn impjant ta' trattament ta' rata għolja, jew jitqies li jkun fih inibituri, huwa għandu jinħasel. Ħallih joqgħod jew iċċentrifuga l-ħama sospiż mill-ġdid wara li jkun tħallat sewwa, warrab il-likwidu supernatant u erġa' ssospendi l-ħama maħsul f'volum ulterjuri ta' midjum minerali. Tenni din il-proċedura sakemm il-ħama jitqies li jkun ħieles minn substrat jew inibitur żejjed.

30. Wara li tkun inkisbet sospensjoni kompleta, jew b'ħama mhux ittrattat, irtira kampjun eżatt qabel l-użu, għad-determinazzjoni tal-piż fin-niexef tas-solidi sospiżi.

31. Alternattiva ulterjuri hija li ħama attivat jiġi omoġeinizzat (3-5 g ta' solidi sospiżi/l). Ittratta l-ħama fi blender Waring għal 2 minuti b'veloċità medja. Ħalli l-ħama mħallat joqgħod għal 30 minuta jew aktar jekk ikun meħtieġ u ferra' l-likwidu għal użu bħala tilqima bir-rata ta' madwar 10 mg/l ta' midjum minerali.

▼M4

32. Tnaqqis ukoll ulterjuri tal-evoluzzjoni CO_2 in bjank jista' jinkiseb billi l-ħama jitrewwaħ matul il-lejl b'arja mingħajr CO_2. Uża 4 mg/l ta' solidi ta' ħama attivat bħala l-konċentrazzjoni tat-tilqima f'dan it-test (13).

Effluwent ta' dranaġġ sekondarju

33. Alternattivament, it-tilqima tista' toriġina mill-effluwent sekondarju ta' impjant ta' trattament jew unità ta' skala ta' laboratorju li tirċievi l-aktar dranaġġ domestiku. Żomm il-kampjun f'kondizzjonijiet aerobiċi u uża fil-jum tal-ġbir, jew ikkondizzjonah minn qabel jekk ikun meħtieġ. L-effluwent għandu jkun iffiltrat permezz ta' filtru raff biex titneħħa materja partikolata ħoxna u jitkejjel il-valur tal-pH.

34. Biex inaqqas il-kontenut ta' IC tiegħu, il-filtrat jitraxxax b'arja mingħajr CO_2 (paragrafu 15-e) għal siegħa filwaqt li l-pH jinżamm f'6,5 billi jintuża aċidu ortofosforiku (paragrafu 20). Il-valur tal-pH jitreġġa għall-valur oriġinali tiegħu bl-idrossidu tas-sodju (paragrafu 21) u, wara li jkun qagħad għal madwar siegħa, volum adatt tas-supernatant jittieħed biex jitlaqqam. Din il-proċedura ta' tixrix tnaqqas il-kontenut ta' IC tat-tilqima. Pereżempju, meta l-volum massimu rrakkomandat ta' effluwent imraxxax iffiltrat (100 ml) għal kull litru kien użat bħala tilqima, l-ammont ta' IC li kien hemm fir-reċipjenti ta' kontroll in bjank kien fil-firxa ta' 0,4 sa 1,3 mg/l (14), li tirrappreżenta 2-6,5 % tal-kimika għall-ittestjar C f'20 mg C/l u 4-13 % f'10 mg C/l.

Ilmijiet tal-wiċċ

35. Jittieħed kampjun ta' ilma tal-wiċċ adatt. Għandu jinżamm f'kondizzjonijiet aerobiċi u jintuża fil-jum tal-ġbir. Il-kampjun għandu jkun ikkonċentrat, jekk ikun meħtieġ, b'filtrazzjoni jew ċentrifugazzjoni. Il-volum ta' tilqima li jkollha tintuża f'kull reċipjent tat-test għandha tħares il-kriterji mogħtijin fil-paragrafu 26.

Ħamrija

36. Jittieħed kampjun ta' ħamrija adatta, miġbura f'fond ta' sa 20 cm taħt il-ħamrija tal-wiċċ. Ġebel, fdalijiet ta' pjanti u invertebrati għandhom jitneħħew mill-kampjun ta' ħamrija qabel ma jintgħarbel b'xibka ta' 2 mm (jekk il-kampjun ikun imxarrab wisq biex jintgħarbel minnufih, f'dak il-każ għandu jitnixxef parzjalment bl-arja biex jitħaffef it-tgħarbil). Għandu jinżamm f'kondizzjonijiet aerobiċi u jintuża fil-jum tal-ġbir (Jekk il-kampjun jinġarr f'borża sewda tal-polietilen maqfula ħafif, ikun jista' jinħżen f'2 sa 4 oC fil-borża sa xahar).

Kondizzjonament minn qabel ta' tilqima

37. Tilqima tista' tkun ikkondizzjonata minn qabel għall-kondizzjonijiet sperimentali, iżda ma tkunx adattata minn qabel għall-kimika għall-ittestjar. Kondizzjonament minn qabel jista' jnaqqas l-evoluzzjoni ta' CO_2 in bjank. Kondizzjonament minn qabel jikkonsisti f'tirwiħ ta' ħama attivat wara dilwizzjoni f'midjum tal-ittestjar għal 30 mg/l b'arja niedja mingħajr CO_2 għal sa 5-7 ijiem fit-temperatura tat-test.

PROĊEDURA TAT-TEST

Għadd ta' fliexken

38. L-għadd ta' fliexken (paragrafu 15-a) meħtieġa għal test ikun jiddependi mill-frekwenza ta' analiżi u minn kemm idum it-test.

39. Huwa rrakkomandat li fliexken tripliċi jkunu analizzati wara għadd suffiċjenti ta' intervalli ta' żmien b'mod li l-perjodu ta' 10-d ikun jista' jiġi identifikat. Ukoll mill-anqas ħames fliexken tat-test (paragrafu 15-a) mis-settijiet (a), (b) u (c) (ara l-paragrafu 42) ikunu analizzati fit-tmiem tat-test, biex ikunu jistgħu jiġu kkalkulati 95 % ta' intervalli ta' kunfidenza għall-valur medju ta' perċentwali ta' bijodegradazzjoni.

▼M4

Midjum imlaqqam

40. It-tilqima tintuża f'konċentrazzjoni ta' 4 mg/l ta' solidi nixfin ta' ħama attivat. Ħejji minnufih qabel l-użu midja mlaqqma b'mod suffiċjenti billi żżid, pereżempju, 2 ml ħama attivat ittrattat sewwa (paragrafi 27 to 32) f'2 000 mg/l għal 1 litru ta' midjum ta' melħ minerali (paragrafu 19). Meta jkollu jintuża effluwent ta' dranaġġ sekondarju żid sa 100 ml effluwent (paragrafu 33) għal midjum ta' 900 ml ta' melħ minerali (paragrafu 19) u ddilwixxi 1 litru bil-midjum.

Tħejjija ta' fliexken

41. Alikwoti ta' midjum imlaqqam jitqiegħdu fi fliexken replikati biex jagħtu proporzjon ta' Spazju Fuq ma' likwidu ta' 1:2 (eż. żid 107 ml fi fliexken li jesgħu 160 ml). Jistgħu jintużaw proporzjonijiet oħra, iżda ara t-twissija mogħtija fil-paragrafu 11. Meta tuża tilqima ta' wieħed miż-żewġ tipi, għandha tingħata attenzjoni biex ikun żgurat li l-midjum imlaqqam jitħallat b'mod adegwat biex ikun żgurat li jitqassam b'mod uniformi fil-fliexken tat-test.

42. Settijiet ta' fliexken (paragrafu 15a) jitħejjew biex jesgħu dan li ġej:

(a) Reċipjent tat-test (indikat F_T) li jkun fih il-kimika għall-ittestjar;

(b) Kontrolli in bjank (indikati F_B) li jkun fihom biss il-midjum tal-ittestjar flimkien ma' tilqima; għandhom jiżdiedu wkoll kull kimika, solventi, aġenti jew filtri tal-fibra tal-ħġieġ użati biex tiddaħħal il-kimika għall-ittestjar fir-reċipjenti tat-test;

(c) Reċipjenti (indikati F_C) biex tkun ivverifikata l-proċedura li jkun fiha l-kimika ta' referenza;

(d) Jekk ikun meħtieġ, reċipjenti (indikati F_I) biex ikun iċċekkjat jekk possibbilment ikunx hemm effett inibitorju tal-kimika għall-ittestjar li jkun fiha kemm il-kimika għall-ittestjar kif ukoll il-kimika ta' referenza fl-istess konċentrazzjonijiet (paragrafu 24) bħal fil-fliexken F_T u F_C, rispettivament;

(e) Reċipjenti (indikati F_S) biex ikun iċċekkjat jekk possibbilment ikunx hemm degradazzjoni abijotika bħal (a) 50 mg/l oħra ta' $HgCl_2$ jew sterilizzati b'xi mezzi oħra (eż. b'għeluq awtomatiku).

43. Kimiċi għall-ittestjar li jinħallu fl-ilma u kimiċi ta' referenza jiżdiedu bħala soluzzjonijiet ta' stokkijiet milwiema (paragrafi 22, 23 u 24) biex jagħtu konċentrazzjoni ta' 10 sa 20 mg C/l.

44. Kimiċi li ma jinħallux u kimiċi ta' referenza li jinħallu jiżdiedu fi fliexken b'varjetà ta' modi (ara l-paragrafu 22a-e) skont in-natura tal-kimika għall-ittestjar, qabel jew wara żieda tal-midjum imlaqqam, skont il-metodu ta' trattament tal-kimika għall-ittestjar. Jekk tkun użata waħda mill-proċeduri mogħtijin fil-paragrafu 22a-e, f'dak il-każ il-fliexken in bjank F_B (paragrafu 42b) għandhom ikunu ttrattati b'mod simili iżda tkun eskluża l-kimika għall-ittestjar jew il-kimika ta' referenza.

45. Kimiċi volatili ta' ttestjar għandhom ikunu injettati għal ġo fliexken issiġillati (paragrafu 47) billi tintuża siringa żgħira. Id-doża tkun ikkalkulata mill-volum injettat u mid-densità tal-kimika għall-ittestjar.

46. Ilma għandu jiżdied f'reċipjenti, fejn ikun meħtieġ, biex jagħti l-istess volum likwidu f'kull reċipjent. Għandu jkun żgurat li l-proporzjon ta' Spazju Fuq ma' likwidu (is-soltu 1:2) u l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ikunu tali li jkun hemm ossiġnu biżżejjed fl-Ispazju Fuq biex titħalla ssir bijodegradazzjoni kompleta.

▼M4

47. Il-fliexken kollha mbagħad jiġu ssiġillati, pereżempju b'septa tal-lastku tal-butil u b'għotjien tal-aluminju. kimiċi volatili tat-testijiet għandhom jiżdiedu f'dan l-istadju (paragrafu 45). Jekk it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni ta' DOC tas-soluzzjoni tat-test ikollu jkun immonitorjat u jkollha ssir analiżi mingħajr ħin għal konċentrazzjoni tal-bidu ta' IC (kontrolli sterili, paragrafu 42e) jew għal determinanti oħra, erfa' kampjun adatt mir-reċipjent tat-test. Ir-reċipjent tat-test u l-kontenut tiegħu mbagħad jitwarrbu.

48. Il-fliexken issiġillati jitqiegħdu fuq xejker rotatorju (paragrafu 15d), b'rata ta' xxejkjar suffiċjenti biex iżżomm il-kontenut tal-fliexken imħallat sewwa u f'sospensjoni (eż. 150 għal 200 rpm), u inkubat fid-dlam f'20 °C, li għandu jinżamm f'± 1 °C.

Teħid ta' kampjuni

49. Ix-xejra ta' teħid ta' kampjuni tkun tiddependi mill-perjodu ta' intervalli u mir-rata kinetika ta' bijodegradazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Il-fliexken jintużaw għall-analiżi u jinqerdu fil-jum tat-teħid tal-kampjuni, li għandu jsir mill-anqas darba fil-ġimgħa jew aktar sikwit (eż. darbtejn fil-ġimgħa) jekk tkun meħtieġa kurva kompleta ta' degradazzjoni. L-għadd meħtieġ għall-fliexken tar-replikati jittieħed mix-xejker, u jirrappreżenta F_T, F_B u F_C u, jekk jintużaw F_I u F_S (ara l-paragrafu 42). It-test normalment idum 28 jum. Jekk il-kurva ta' bijodegradazzjoni tindika li tkun intlaħaq livell kostanti qabel 28 jum, it-test jista' jingħalaq qabel 28 jum. Ħu kampjuni minn ħames fliexken riżervati għat-28 jum tat-test għal analiżi u uża r-riżultati biex tikkalkula l-limiti ta' kunfidenza jew il-koeffiċjent ta' varjazzjoni ta' perċentwali ta' bijodegradazzjoni. Fliexken li jirrappreżentaw il-verifiki għal inibizzjoni u għal degradazzjoni abijotika jistgħu ma jitteħdulhomx kampjuni sikwit daqs il-fliexken l-oħra; 1 jum u 28 jiem ikunu suffiċjenti.

Analiżi ta' karbonju inorganiku (IC)

50. Il-produzzjoni ta' CO_2 fil-fliexken tkun iddeterminata billi titkejjel iż-żieda fil-konċentrazzjoni ta' karbonju inorganiku (IC) matul inkubazzjoni. Hemm żewġ metodi rakkomandati disponibbli għall-kejl tal-ammont ta' IC prodott fit-test, u dawn huma deskritti minnufih hawn taħt. Minħabba li l-metodi jistgħu jagħtu riżultati ftit differenti, wieħed biss għandu jintuża meta jsir test.

51. Metodu (a) huwa rrakkomandat jekk il-midjum aktarx li jkun fih fdalijiet ta', pereżempju, karta ta' filtru tal-ħġieġ u/jew kimika għall-ittestjar li ma tinħallx. Din l-analiżi tista' ssir billi jintuża kromatografu tal-gass jekk ma jkunx hemm analizzatur tal-karbonju. Huwa importanti li l-fliexken ikunu fi jew qrib it-temperatura tat-test meta l-gass tal-Ispazju Fuq ikun analizzat. Metodu (b) jista' jkun eħfef għal laboratorji li jużaw analizzaturi tal-karbonju biex ikejlu IC. Huwa importanti li s-soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju (paragrafu 21) użata biex CO_2 jinbidel f'karbonat tkun jew tħejjiet m'ilux jew li l-kontenut ta' IC ikun magħruf, biex din tkun tista' titqies meta jkunu kkalkulati r-riżultati tat-testijiet (ara l-paragrafu 66-b.)

Metodu (a): aċidifikazzjoni għal pH < 3

52. Qabel kull lott ta' analiżi, l-analizzatur ta' IC jiġi kkalibrat billi jintuża standard ta' IC adattat (eż. 1 % w/w CO_2 f'N_2). Aċidu ortofosforiku konċentrat (paragrafu 20) jiġi injettat tul is-septum ta' kull flixkun li jkun itteħidlu kampjun biex ibaxxi l-pH tal-midjum għal < 3 (eż. żid 1 ml għal midjum tal-ittestjar ta' 107 ml). Il-fliexken jitreġġgħu fuq ix-xejker. Wara li jkunu xxejkjati għal siegħa f'temperatura tat-test il-fliexken jitneħħew mix-xejker, alikwoti (eż. 1 ml) tal-gass ikunu rtirati mill-Ispazju Fuq ta' kull flixkun u injettati fl-analizzatur ta' IC. Il-konċentrazzjonijiet imkejla ta' IC ikunu rreġistrati bħala mg C/l.

▼M4

53. Il-prinċipju ta' dan il-metodu huwa li wara aċidifikazzjoni għal pH < 3 u ekwilibrazzjoni f'20 C, il-kostant tal-ekwilibriju għad-distribuzzjoni ta' CO_2 bejn il-fażijiet likwidi u gassużi fil-fliexken tat-test ikun 1,0 meta mkejjel bħala konċentrazzjoni (13). Dan għandu jintwera għas-sistema tat-test mill-anqas darba kif ġej:

Lesti fliexken li jkun fihom 5 u 10 mg/l bħala IC billi tuża soluzzjoni ta' karbonat tas-sodju anidru (Na_2 CO_3) f'ilma mingħajr CO_2 mħejji bl-aċidifikazzjoni tal-ilma għal pH 6,5 b'aċidu ortofosforiku konċentrat (paragrafu 20), b'tixrix matul l-lejl b'arja mingħajr CO_2 u billi tgħolli l-pH għal newtralità b'alkali. Żgura li l-proporzjon tal-volum tal-Ispazju Fuq mal-volum ta' likwidu jkun l-istess bħal fit-testijiet (eż. 1:2). Agħmel aċiduż u ekwilibra kif deskritt fil-paragrafu 52, u kejjel il-konċentrazzjonijiet ta' IC kemm tal-Ispazju Fuq kif ukoll tal-fażijiet likwidi. Ivverifika li ż-żewġ konċentrazzjonijiet ikunu l-istess fil-limitu ta' żbalji sperimentali. Jekk ma jkunux, l-operatur għandu jeżamina mill-ġdid il-proċeduri. Din il-verifika tad-distribuzzjoni ta' IC bejn fażijiet likwidi u gassużi tista' ma ssirx kull darba li jsir it-test; preżumibbilment tista' ssir waqt li tkun qed issir il-kalibrazzjoni.

54. Jekk it-tneħħija ta' DOC ikollha titkejjel (kimiċi għall-ittestjar biss li jinħallu fl-ilma), għandhom jittieħdu kampjuni tal-faża likwida minn fliexken separati (mhux magħmulin aċiduż), iffiltrati b'membrana u injettati għal ġol-analizzatur ta' DOC. Dawn il-fliexken jistgħu jintużaw għal analiżi oħra daqs kemm ikun meħtieġ, biex titkejjel bijodegradazzjoni primarja.

Metodu (b): konverżjoni ta' CO_2 għall-karbonat

55. Qabel kull lott ta' analizi, l-analizzatur ta' IC ikun ikkalibrat billi jintuża standard adattat - pereżempju, soluzzjoni ta' sodju bikarbonat ($NaHCO_3$) f'ilma mingħajr CO_2 (ara l-paragrafu 53) fil-firxa 0 sa 20 mg/l bħala IC. Soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju (7M, paragrafu 21) (eż. 1 ml għal midjum ta' 107 ml) tiġi injettata tul is-septum ta' kull flixkun li jkun ittieħidlu kampjun u l-fliexken jiġu xxejkjati għal siegħa fit-temperatura tat-test. Uża l-istess soluzzjoni ta' NaOH għall-fliexken kollha li jintużaw u jinqerdu f'jum partikolari, iżda mhux neċessarjament f'kull okkażjoni li jittieħed kampjun tul it-test kollu. Jekk ikunu meħtieġa valuri IC assoluti in bjank fl-okkażjonijiet kollha ta' teħid ta' kampjuni, ikunu meħtieġa determinazzjonijiet ta' IC tas-soluzzjoni ta' NaOH kull darba li tintuża. Il-fliexken jitneħħew mix-xejker u jitħallew joqogħdu. Volumi adatti (eż. 50 għal 1 000 µl) tal-faża likwida f'kull reċipjent jittieħdu b'siringa. Il-kampjuni jiġu injettati għal ġol-analizzatur IC u l-konċentrazzjonijiet ta' IC jiġu rreġistrati. Għandu jkun żgurat li l-analizzatur użat ikun mgħammar sewwa biex ikun jista' jittratta kampjuni alkalini prodotti b'dan il-metodu.

56. Il-prinċipju ta' dan il-metodu huwa li wara ż-żieda ta' alkali u xxejkjar, il-konċentrazzjoni ta' IC fl-Ispazju Fuq tkun negliġibbli. Dan għandu jkun ivverifikat għas-sistema ta' ttestjar mill-anqas darba billi jintużaw standards IC, biż-żieda ta' alkali u ekwilibrazzjoni, u bil-kejl tal-konċentrazzjoni ta' IC kemm fl-Ispazju Fuq kif ukoll fil-fażijiet likwidi (ara l-paragrafu 53). Il-konċentrazzjoni fl-ispazju fuq għandha tersaq għal żero. Din il-verifika tal-assorbiment kważi sħiħ ta' CO_2 ma jkunx meħtieġ li ssir kull darba li jsir it-test.

57. Jekk it-tneħħija ta' DOC ikollha titkejjel (kimiċi għall-ittestjar biss li jinħallu fl-ilma), għandhom jittieħdu kampjuni tal-faża likwida minn fliexken separati (li ma jkunx fihom alkali miżjuda), iffiltrati b'membrana u injettati għal ġol-analizzatur ta' DOC. Dawn il-fliexken jistgħu jintużaw għal analiżi oħra daqs kemm ikun meħtieġ, biex titkejjel bijodegradazzjoni primarja.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

Kalkolu tar-riżultati

58. Jekk wieħed jassumi mineralizzazzjoni ta' 100 % tal-kimika għall-ittestjar għal CO_2, ThIC iżjed minn dak prodott fil-kontrolli in bjank ikun daqs TOC miżjud għal kull flixkun tat-test fil-bidu tat-test, jiġifieri:

$$ThIC = TOC.$$

Il-massa totali (mg) ta' karbonju inorganiku (TIC) f'kull flixkun tkun:

$$TIC = (\text{mg C fil} - \text{likwidu} + \text{mg C fl} - \text{ispazju fuq}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Ekwazzjoni [1]}$$

fejn:

VL = volum ta' likwidu fil-flixkun (litru);

CL = konċentrazzjoni ta' IC fil-likwidu (mg/l bħala karbonju);

VH = volum tal-ispazju fuq (litru);

CH = konċentrazzjoni ta' IC fl-ispazju fuq (mg/l bħala karbonju).

Il-kalkulazzjonijiet ta' TIC għaż-żewġ metodi analitiċi użati għall-kejl ta' IC f'dan it-test huma deskritti fil-paragrafi 60 u 61. Perċentwali ta' bijodegradazzjoni (% D) f'kull każ tidher bħala:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{Ekwazzjoni [2]}$$

fejn:

TICt = mg ta' TIC fi flixkun tat-test f'ħin t;

TICb = mg medja ta' TIC fi fliexken in bjank f'ħin t;

TOC = mg ta' TOC miżjuda fil-bidu fir-reċipjent tat-test.

Il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni ta' % ta' D ikun ikkalkulat għat-test (F_T), referenza (F_C) u, jekk ikun inkluż kontroll ta' monitoraġġ ta' inibizzjoni (F_I), għall-fliexken mill-ammonti rispettivi ta' TIC prodotti sażżmien ta' kull teħid ta' kampjuni.

59. Jekk kien hemm żieda sinifikanti fil-kontenut ta' TIC tal-kontrolli sterili (F_S) tul il-perjodu ta' test, f'dak il-każ wieħed jista' jikkonkludi li tkun seħħet degradazzjoni abijotika tal-kimika għall-ittestjar u din għandha titqies fil-kalkulazzjoni ta' D fl-Ekwazzjoni [2].

Aċidifikazzjoni għal pH < 3

60. Minħabba li l-aċidifikazzjoni għal pH < 3 u l-ekwilibrazzjoni biex il-konċentrazzjoni ta' TIC fil-likwidu u fil-fażijiet gassużi tkun indaqs, il-konċentrazzjoni biss ta' IC fil-fażi ta' gass tkun jeħtiġilha titkejjel. Għalhekk, mill-ekwazzjoni [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, fejn V_B volum ta' flixkun tas-serum.

Bdil ta' CO_2 għal karbonat

61. F'dan il-metodu jsiru kalkulazzjonijiet bħal fl-Ekwazzjoni [1], iżda ma jitqisx l-ammont negliġibbli ta' IC fil-fażi gassuża, jiġifieri $V_H \times C_H = 0$, u $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Espressjoni ta' riżultati

62. Kurva ta' bijodegredazzjoni tinkiseb bl-ipplottjar tal-persentaġġ ta' bijodegredazzjoni, D, kontra l-ħin tal-inkubazzjoni u jekk possibbli, il-fażi ta' intervalli, il-fażi ta' bijodegredazzjoni, il-perjodu ta' 10-d u l-fażi ta' livell kostanti, il-fażi li fiha d-degredazzjoni massima tkun intlaħqet u l-kurva tal-bijoddegredazzjoni llivellat, kif hemm indikat. Jekk jinkisbu riżultati komparabbli għar-reċipjenti tat-test parallelli F_T (< 20 % differenza), tiġi pplottjata kurva medja (ara l-Appendiċi 2, Fig. 1); jekk le, il-kurvi jiġu pplottjati għal kull reċipjent. Ikun iddeterminat il-valur medju tal-perċentwali ta' bijodegradazzjoni fil-fażi ta' livell kostanti jew ikun ivvalutat l-ogħla valur (eż. meta l-kurva tonqos fil-fażi ta' livell kostanti), iżda huwa importanti li jkun ivvalutat li f'dan l-aħħar każ il-valur ma jkunx erratiku. Indika dan il-livell massimu ta' bijodegradazzjoni bħala "grad ta' bijodegradazzjoni tal-kimika għall-ittestjar" fir-rapport tat-test. Jekk l-għadd ta' reċipjenti tat-test ma kienx biżżejjed biex jindika fażi ta' livell kostanti, id-dejta mkejla tal-aħħar jum tat-test tintuża biex ikun ikkalkulat valur medju. Dan l-aħħar valur, il-medja ta' ħames replikati, iservi biex jindika l-preċiżjoni li biha l-perċentwali ta' bijodegradazzjoni kien iddeterminat. Irrapporta wkoll il-valur miksub fit-tmiem tal-perjodu ta' 10-d.

63. Fl-istess mod, tiġi pplottjata kurva għall-kimika ta' referenza F_C u, jekk inkluża għall-kontroll ta' eliminazzjoni abijotika F_S u l-kontroll ta' inibizzjoni F_I.

64. L-ammonti ta' TIC preżenti fil-kontrolli in bjank (F_B) jiġu repistrati kif inhuma rreġistrati dawk fil-fliexken F_S (kontroll abijotiku), jekk dawn ir-reċipjenti kienu inklużi fit-test.

65. Ikkalkula D għar-reċipjenti F_I abbażi tar-rendiment IC teoretiku antiċipat mill-komponent ta' referenza tat-taħlita biss. Jekk, fit-28 jum, jirriżulta $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}]$ x 100 > 25 %, wieħed ikun jista' jassumi li l-kimika għall-ittestjar tkun waqqfet l-attività tat-tilqima, u dan jista' jkun il-kawża ta' valuri baxxi ta' D_{FT} miksubin taħt il-kondizzjonijiet tat-test. F'dan il-każ it-test jista' jittenna billi tintuża konċentrazzjoni tat-test aktar baxxa u preferibbilment jitnaqqsu DIC fit-tilqima u TIC ffurmat fil-kontrolli in bjank, minħabba li konċentrazzjoni aktar baxxa xort'oħra tnaqqas mill-preċiżjoni tal-metodu. Alternattivament, tista' tintuża tilqima oħra. Jekk fi flixkun F_S (abijotiku) tkun osservata żieda sinifikanti (> 10 %) fl-ammont ta' TIC, jistgħu jkunu seħħew proċessi ta' degradazzjoni abijotika.

Validità ta' riżultati

66. Test jitqies validu jekk:

(k) il-perċentwali medju ta' degradazzjoni f'reċipjenti F_C li jkun fihom il-kimika ta' referenza jkun > 60 % sal-14-il jum ta' inkubazzjoni; u

(l) l-ammont medju ta' TIC li jkun hemm fil-kontrolli F_B in bjank fit-tmiem tat-test ikun > 3 mg C/l.

Jekk dawn il-limiti ma jitħarsux, it-test għandu jittenna b'tilqima minn sors ieħor u/jew il-proċeduri użati għandhom ikunu eżaminati mill-ġdid. Pereżempju, jekk il-produzzjoni għolja ta' IC in bjank tkun problema, għandha tkun segwita l-proċedura mogħtija fil-paragrafi 27 sa 32.

(1) Il-perċentwali ta' degradazzjoni f'Reċipjenti F_C li jkun fihom is-sustanza ta' referenza
(2) Il-perċentwali ta' degradazzjoni f'Reċipjenti F_I

▼M4

67. Jekk il-kimika għall-ittestjar ma tilħaqx 60 % ThIC u ma jkunx intwera li kienet inibitorja (paragrafu 65), it-test jista' jittenna b'konċentrazzjoni oġħla ta' tilqim (sa 30 mg/l ta' ħama attivat u 100 ml ta' effluwent/l) jew b'tilqimiet minn sorsi oħra, l-aktar jekk id-degradazzjoni kienet fil-firxa ta' 20 sa 60 %.

Interpretazzjoni tar-riżultati

68. Bijodegradazzjoni > 60 % ThIC fil-perjodu ta' 10-d f'dan it-test turi li l-kimika għall-ittestjar tkun bijodegradabbli faċilment f'kondizzjonijiet aerobiċi.

69. Jekk il-valur ta' pass ta' 60 % ThIC ma jintlaħaqx, iddetermina l-valur pH f'midja fi fliexken li jkunux saru aċiduż jew alkalini; valur ta' anqas minn 6.5 jista' jindika li tkun seħħet nitrifikazzjoni. F'każ bħal dan tenni t-test b'soluzzjoni bafer ta' konċentrazzjoni oġħla.

Rapport tat-Test

70. Ikkompila tabella ta' % ta' D għal kull test (F_T), referenza (F_C) u, jekk ikun inkluż, flixkun ta' inibizzjoni ta' kontroll (F_I) għal kull jum li fih ikunu ttieħdu kampjun. Jekk jinkisbu riżultati komparabbli għal fliexken replikati, immarka kurva ta' medja ta' % ta' D mal-ħin. Irreġistra l-ammont ta' TIC fl-in bjanki (F_B) u fil-kontrolli sterili (F_S) DOC u/jew f'determinanti oħra, u fil-perċentwali ta' tneħħija tagħhom.

71. Iddetermina l-valur medju ta' % ta' D fil-fażi ta' livell kostanti, jew uża l-oġħla valur jekk il-kurva ta' bijodegradazzjoni tonqos fil-fażi ta' livell kostanti, u rrapporta dan bħala 'grad ta' bijodegradazzjoni tal-kimika għall-ittestjar'. Huwa importanti jkun żgurat li f'dan l-aħħar każ l-oġħla valur ma jkunx erratiku.

72. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

— isem komuni, isem tal-kimika, numru tal-CAS, formula strutturali u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti;

— purezza (impuritajiet) ta' kimika għall-ittestjar.

Kondizzjonijiet tat-test:

— referenza għal dan il-Metodu ta' Ttestjar;

— deskrizzjoni tas-sistema ta' ttestjar użata (eż. volum tar-reċipjent, proporzjon ta' Spazju Fuq ma' likwidu, metodu ta' taħwid, eċċ);

— applikazzjoni ta' kimika għall-ittestjar u kimika ta' referenza għal sistema ta' ttestjar: konċentrazzjoni tat-test użata u ammont ta' karbonju ddożat f'kull flixkun tat-test, kull użu ta' solventi;

— dettalji tat-tilqima użat, kull trattament minn qabel u kondizzjonament minn qabel;

— temperatura ta' inkubazzjoni;

— validazzjoni tal-prinċipju ta' analiżi ta' IC;

— karatteristiċi ewlenin tal-analizzatur ta' IC użat (u kull metodu analitiku ieħor użat);

— għadd ta' replikati.

Riżultati:

— dejta mhux maħduma u valuri kkalkulati ta' bijodegradabbiltà f'forma tabulari;

▼M4

— il-grafika ta' perċentwali ta' degradazzjoni mal-ħin għat-test u kimiċi ta' referenza, il-fażi ta' intervalli, fażi ta' degradazzjoni, perjodu ta' 10-d u anglu;

— perċentwali ta' tneħħija f'livell kostanti, fi tmiem ta' test, u wara perjodu ta' 10-d;

— raġunijiet għal kull twarrib tar-riżultati tat-testijiet;

— kull fatt ieħor li jkun rilevanti għall-proċedura segwita;

— diskussjoni dwar ir-riżultati.

LETTERATURA:

(1) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness: Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà 'Faċli' – Test ta' Evoluzzjoni ta' CO_2 (Metodu C.4-C).

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼M4

(16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness: Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà 'Faċli'.

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness: Test ta' inibizzjoni ta' respirazzjoni ta' ħama attivat.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) UE (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Appendiċi 1

ABBREVJAZZJONIJIET U DEFINIZZJONIJIET

IC: Karbonju inorganiku

ThCO_2: Id-dijossidu tal-karbonju teoretiku (mg) huwa l-kwantità ta' dijossidu tal-karbonju kkakluat li għandu jiġi prodott mill-kontentu tal-karbonju magħruf jew imkejjel tal-kimika għall-ittestjar meta jiġi minerallizzat kompletament; espress ukoll bħala mg ta' dijossidu tal-karbonju għal kull mg ta' kimika għall-ittestjar.

DOC: Karbonju organiku maħlul huwa l-karbonju organiku li jkun hemm f'soluzzjoni jew dak li jgħaddi minn filtru ta' 0,45 mikromiter jew jibqa' fis-supernatant wara ċentrifugazzjoni f'madwar 4 000 g (dwar 40 000 m sec^{-2}) għal 15-il minuta.

DIC: Karbonju inorganiku maħlul.

ThIC: Karbonju inorganiku teoretiku

TIC: Karbonju organiku totali

Bijodegradabbli faċilment: Klassifikazzjoni arbitrarja tal-kimiċi li għaddew ċerti testijiet speċifiċi tal-iskrining għall-bijodegredabbiltà ultima; dawn it-testijiet tant huma stretti li huwa assunt li tali kimiċi se jibbijodegredaw malajr u kompletament f'ambjenti akkwatiċi taħt kondizzjonijeit aerobiċi.

Perjodu ta' 10-d: L-10 ijiem li jsegwu immedjatament il-kisba t'a 10 % bijodegredazzjoni.

Bijodegradabbiltà inerenti: Klassifikazzjoni tal-kimiċi li għalihom hemm evidenza inekwivoka ta' bijodegredazzjoni (primarja jew ultima) fi kwalunkwe test ta' bijodegradabbiltà.

Bijodegradazzjoni aerobika ultima: Il-livell ta' degradazzjoni miksuba meta il-kimika għall-ittestjar tiġi totalment utilizzata minn mikroorganiżmi li jirriżultaw fil-produzzjoni tad-dijossidu tal-karbonju, l-ilma, imluħa minerali u kostitwenti ċellulari mikrobjali ġodda (bijomassa).

Mineralizzazzjoni: Mineralizzazzjoni hija d-degradazzjoni kompleta ta' kimika organika għal CO_2 u H_2O f'kondizzjonijiet aerobiċi, u għal CH_4, CO_2 u H_2O f'kondizzjonijiet anaerobiċi.

Faži ta' intervalli: Iż-żmien mill-bidu ta' test sa akklimatazzjoni u/jew adattament tal-mikroorganiżmi qed jiddegradaw ikun intlaħaq u l-grad ta' bijodegradazzjoni ta' kimika għall-ittestjar jew ta' materja organika jkun żdied sa livell li wieħed ikun jista' jinduna bih (p. eż. 10 % tal-bijodegradazzjoni teoretika massima, jew aktar baxxa, skont kemm tkun akkurata t-teknika tal-kejl).

Faži ta' degradazzjoni: Iż-żmien mit-tmiem tal-perjodu ta' intervalli saż-żmien meta jkun intlaħaq 90 % tal-livell massimu ta' degradazzjoni.

Faži ta' livell kostanti: Faži ta' livell kostanti hija l-faži li fiha d-degradazzjoni tilħaq l-aqwa tagħha u l-kurva tal-bijodegradazzjoni tkun sabet il-livell tagħha.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

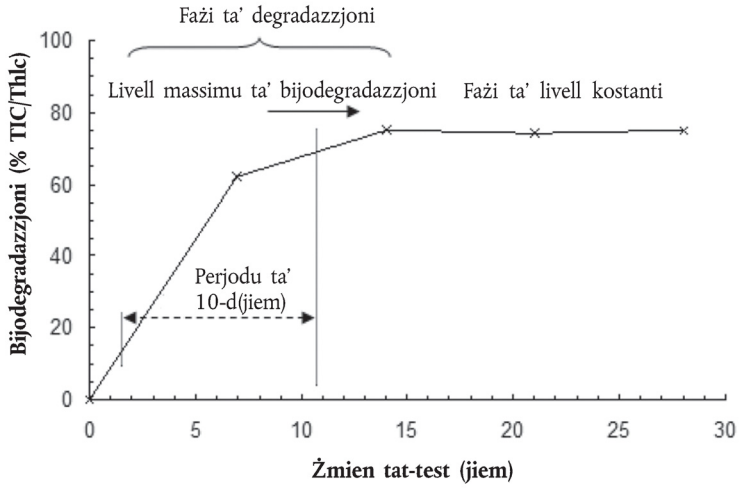
▼M4

Appendiċi 2

Eżempju ta' kurva ta' bijodegradazzjoni

Figura 1

Bijodegradazzjoni ta' ottanol-1 fit-test ta' Spazju Fuq ta' CO_2 Glossarju



Biodegradation:

Bijodegradazzjoni:

Faži ta' degradazzjoni:

Livell massimu ta' bijodegradazzjoni:

Faži ta' livell kostanti:

Perjodu ta' 10-d(jiem):

Żmien tat-test (jiem):

▼M4

C.30. **AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' OLIGOCHAETES TERRESTRI**

DAĦLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 317 (2010) tal-OECD. Fost il-Metodi ta' Ttestjar relatati ma' dak li jseħħ fl-ambjent, il-Konċentrazzjoni Bijoloġika: Test ta' Fluss Kontinwu tal-Ħut (il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness (49)) u l-Akkumulazzjoni bijoloġika ta' Oligochaetes tal-Qiegħ li jgħixu f'sediment (53) kienu ppubblikati fl-1996 u fl-2008 rispettivament. L-estrapolazzjoni ta' dejta dwar akkumulazzjoni bijoloġika akwatika għal organiżmi terrestri bħal ħniex hija diffiċli, jekk possibbli wara kollox. Kalkulazzjonijiet mudelli bbażati fuq il-lipofiliċità ta' kimika għall-ittestjar, eż. (14) (37), bħalissa jintużaw għall-valutazzjoni ta' akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimiċi fil-ħamrija, bħal eż. fid-Dokument ta' Gwida Teknika tal-UE (19). Il-ħtieġa ta' metodu ta' ttestjar speċifiku għal kompartiment diġà kienet indirizzata, eż. (55). Metodu bħal dan huwa l-aktar importanti għall-evalwazzjoni ta' vvelenar sekondarju f'katini terrestri tal-ikel (4). Diversi metodi ta' testijiet nazzjonali jindirizzaw il-kwistjoni ta' akkumulazzjoni bijoloġika f'organiżmi minbarra l-ħut, eż. (2) u (72). Metodu dwar il-kejl ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn ħamrija kontaminata fi ħniex (*Eisenia fetida*, Savigny) u f'dud abjad kien żviluppat mill-American Society for Testing and Materials (3). Metodu aċċettat internazzjonalment għad-determinazzjoni ta' akkumulazzjoni bijoloġika f'ħamrija mħallta għandu jtejjeb il-valutazzjoni tar-riskju ta' kimiċi f'ekosistemi terrestri eż. (25) (29).

2. Invertebrati li jiddiġerixxu l-ħamrija huma esposti għal kimiċi li jkunu fil-ħamrija. Fost dawn l-annimali, oligochaetes terrestri jaqdu rwol importanti fl-istruttura u l-funzjoni tal-ħamrija (15) (20). Oligochaetes terrestri jgħixu fil-ħamrija u parzjalment fil-wiċċ tal-ħamrija (l-aktar fis-saff taż-żibel); ta' sikwit jirrappreżentaw l-ispeċi l-aktar abbundanti f'termini ta' bijomassa (54). Bit-taqlib bijoloġiku tal-ħamrija u billi jservu ta' priża dawn l-annimali jista' jkollhom influwenza kbira biex bijoloġikament ikun hemm kimiċi għal organiżmi oħra bħal invertebrati (eż. araknidi predaturi u ħanfus; eż. (64)) jew predaturi vertebrati (eż. volpijiet u gawwi) (18) (62). Xi speċijiet ta' oligochaetes terrestri bħalissa użati f'ittestjar ekotossikoloġiku huma deskritti fl-Appendiċi 5.

3. Il-Gwida Standard ASTM biex Isiru Testijiet fil-Laboratorju għal Tossiċità fil-Ħamrija jew Akkumulazzjoni Bijoloġika bil-Ħanex Lumbriċida *Eisenia fetida* u bil-Ħanex l-Abjad Enchytraeid *Enchytraeus albidus* (3) tipprovdi ħafna dettalji essenzjali u utli għal dak li jagħmel bħalissal-Metodu ta' Ttestjar dwar l-akkumulazzjoni bijoloġika fil-ħamrija. Aktar dokumenti li ssir referenza għalihom f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huma l-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness, Konċentrazzjoni Bijoloġika: Test ta' Fluss Kontinwu tal-Ħut (49) u OECD TG 315: Akkumulazzjoni Bijoloġika f'Oligochates tal-Qiegħ li jgħixu f'sediment (53). Esperjenza prattika fi studji u pubblikazzjonijiet mil-letteratura dwar akkumulazzjoni bijoloġika ta' ħamrija, eż. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79) hija wkoll għajn ewlenija ta' informazzjoni għal dan il-Metodu ta' Ttestjar.

4. Dan il-metodu ta' Ttestjar japplika l-aktar għal kimiċi organiċi stabbli u newtrali li jittendu li jassorbixxu mill-ħamrija. Ittestjar għal akkumulazzjoni bijoloġika f'komposti metallorganiċi assoċjati mal-ħamrija, stabbli, jista' jkun possibbli ma' dan il-Metodu ta' Ttestjar. Huwa wkoll applikabbli għal metalli u għal mikroelementi.

PREREKWIŻIT

5. Testijiet biex titkejjel il-akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimika f'oligochaetes terrestri saru b'metalli tqal (ara eż. (63)) u b'kimiċi persistenti, oganiċi li għandhom valuri log Kow bejn 3.0 u 6.0 eż. (40). Testijiet bħal dawn japplikaw ukoll għal:

— kimiċi li juru log K_{ow} ta' aktar minn 6.0 (kimiċi superidrofobiċi);

▼M4

— kimiċi li jappartienu lil klassi ta' kimiċi organiċi magħrufin li għandhom il-potenzjal jakkumulaw bijoloġikament f'organiżmi ħajjin, eż. kimiċi attivi fil-wiċċ jew li jassorbixxu ħafna;

— kimiċi li jindikaw il-potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika minn karatteristiċi strutturali, eż. analogi ta' kimiċi b'potenzjal magħruf għal akkumulazzjoni bijoloġika; u

— Metalli.

6. Informazzjoni dwar il-kimika għall-ittestjar bħal isem komuni, isem tal-kimika (preferibbilment isem IUPAC), formula strutturali, numru tar-reġistru tal-CAS, purezza, prekawzjonijiet ta' sikurezza, kondizzjonijiet ta' ħżin adatti u metodi analitiċi għandhom jinkisbu qabel ma jinbeda l-istudju. Barra minn dan, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja:

(a) solubilità fl-ilma;

(b) koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma, $K_{ow;}$

(c) koeffiċjent tal-partizzjoni ħamrija-ilma, espress bħala $K_{oc;}$

(d) pressjoni tal-fwar;

(e) degradabbiltà (eż. fil-ħamrija, ilma);

(f) metaboliti magħrufin.

7. Jistgħu jintużaw kimiċi għall-ittestjar b'tikketa radju jew mhux b'tikketta radju. Iżda biex l-analiżi titħaffef huwa rrakkomandat li tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radju. Id-deċiżjoni ssir abbażi tal-limiti ta' detezzjoni jew ta' rekwiżit biex jitkejlu kimika għall-ittestjar u metaboliti prinċipali. Jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radju u jitkejlu residwi radjuattivi totali, huwa importanti li r-residwi b'tikketta radju kemm fil-ħamrija kif ukoll fl-organiżmi tat-test ikunu kkaratterizzati għal perċentwali ta' kimika prinċipali tat-test u b'tikketta li ma jkunux prinċipali, eż. f'kampjuni meħudin fi stat regolari jew fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment, biex titħalla ssir kalkulazzjoni ta' fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika (BAF) għall-kimika prinċipali tat-test u għal metaboliti tal-ħamrija ta' tħassib (ara l-paragrafu 50). Il-metodu deskritt hawn jista' jkollu jiġi mmodifikat, eż., biex jipprovdi bijomassa suffiċjenti, biex ikejjel kimiċi għall-ittestjar jew ta' metalli mingħajr tikketta radju. Meta jitkejlu residwi radjuattivi totali (billi tingħadd xintillazzjoni likwida wara estrazzjoni, kombustjoni jew taħlil ta' tessuti), il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika jkun ibbażat fuq il-kimika prinċipali tat-test u tal-metaboliti. Il-kalkulazzjoni tal-BAF preferibbilment għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni tal-kimika prinċipali tat-test fl-organiżmi u f'residwi radjuattivi totali. Sussegwentement, il-fattur ta' akkumulazzjoni bijota-ħamrija (BSAF), normalizzat għall-kontenut ta' lipidi ta' kontenut ta' dud u ta' karbonju organiku (OC) ta' ħamrija għandu jkun ikkalkulat mill-BAF għal raġunijiet ta' tqabbil bejn riżultati minn testijiet differenti ta' akkumulazzjoni bijoloġika.

8. It-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għall-ispeċijiet użati fit-test għandha tkun magħrufa, eż. konċentrazzjoni ta' effetti (ECx) jew konċentrazzjoni letali (LCx) għaż-żmien tal-fażi ta' assorbiment (eż. (19)). Il-konċentrazzjoni magħżula tal-kimika għall-ittestjar preferibbilment għandha tkun madwar 1 % ta' LC_{50}, asimptotika akuta tagħha, u mill-anqas għaxar darbiet aktar ogħla mil-limitu tal-detezzjoni tagħha fil-ħamrija bil-metodu analitiku użat. Jekk ikunu disponibbli, għandha tingħata preferenza lil valuri ta' tossiċità derivati minn studji fit-tul dwar punti ta' tmiem subletali (51) (52). Jekk dejta bħal din ma tkunx disponibbli, test għal tossiċita akuta għandu jipprovdi informazzjoni utli (ara eż. (23)).

▼M4

9. Metodu analitiku adatt ta' akkuratezza, preċiżjoni u sensittività magħrufa għall-kwantifikazzjoni tal-kimika fis-soluzzjonijiet tat-testijiet, fil-ħamrija, u fil-materjal bijoloġiku għandu jkun disponibbli, flimkien ma' dettalji dwar tħejjija u ħżin ta' kampjuni, kif ukoll skedi materjali ta' dejta ta' sikurezza. Limiti analitiċi ta' detezzjoni tal-oġġett tat-test fil-ħamrija u f'tessut ta' dud ukoll għandhom ikunu magħrufin. Jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta 14C, ir-radjuattività speċifika (jiġifieri Bq mol-1) u l-perċentwali ta' radjuattività assoċjat ma' impuritajiet għandhom ikun magħrufa. Ir-radjuattività speċifika tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun għolja biżżejjed biex tiffaċilità analiżi, u l-konċentrazzjonijiet tat-test użati m'għandhomx jirriżultaw f'effetti tossiċi.

10. It-test jista' ssir b'ħamrija artifiċjali jew b'ħamrija naturali. Informazzjoni dwar karatteristiċi tal-ħamrija naturali użata, eż. l-oriġni tal-ħamrija jew il-kostitwenti tagħha, pH, kontenut ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partiċelli (perċentwali ta' ramel, fajd u tafal), u kemm tkun kapaċi żżomm ilma (WHC), għandha tkun magħrufa qabel ma jibda t-test (3) (48).

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Il-parametri li jikkaratterizzaw il-akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar jinkludu l-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika (BAF), il-kostant tar-rata ta' assorbiment (k_s) u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e). Definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

12. It-test jikkonsisti f'żewġ fażijiet: il-fażi ta' assorbiment (espożizzjoni) u l-fażi ta' eliminazzjoni (wara espożizzjoni). Matul il-fażi ta' assorbiment, gruppi replikati ta' dud ikunu esposti għall-ħamrija, li tkun tħalltet mal-kimika għall-ittestjar. Flimkien mal-annimali tat-test, gruppi ta' dud ta' kontroll jinżammu f'kondizzjonijiet identiċi mingħajr il-kimika għall-ittestjar. Jitkejlu l-piż fin-niexef u l-kontenut ta' lipidi tal-organiżmi tat-test. Dan jista' jsir billi jintuża dud tal-grupp ta' kontroll. Jistgħu jinkisbu valuri ta' sfond analitiku (in bjank) billi jkunu analizzati kampjuni tad-dud ta' kontroll u tal-ħamrija. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud jiġi ttrasferit għal ħamrija ħielsa mill-kimika għall-ittestjar. Fażi ta' eliminazzjoni hija dejjem meħtieġa sakemm l-assorbiment tal-kimika għall-ittestjar matul il-fażi ta' espożizzjoni ma jkunx insinifikanti. Fażi ta' eliminazzjoni tipprovdi informazzjoni dwar ir-rata li biha l-kimika għall-ittestjar tinħareg 'il barra bħal ħmieġ mill-ġisem mill-organiżmi tat-test (eż. (27)). Jekk ma jkunx intlaħaq stat regolari matul il-fażi ta' assorbiment, id-determinazzjoni tal-parametri kinetiċi – fattur BAFk ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika, kostant(i) ta' rati ta' assorbiment u eliminazzjoni – għandha preferibbilment tkun ibbażata fuq l-issettjar simultanju tar-riżultati tal-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fid-dud u fuqu tkun immonitorjata t-tul kollu taż-żewġ fażijiet tat-test.

13. Matul il-fażi ta' assorbiment, jittieħdu kejlijiet ta' teħid ta' kampjuni sa 14-il jum (enchytraeids) jew 21 jum (ħniex) sakemm jintlaħaq l-istat regolari (11) (12) (67). L-istat regolari jseħħ meta grafika tal-konċentrazzjoni f'dud mal-ħin tkun parallela mal-assi tal-ħin, u tliet analiżi suċċessivi ta' konċentrazzjoni magħmulin fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' mill-anqas jumejn ma jvarjawx aktar minn ± 20 % waħda mill-oħra abbażi ta' tqabbiliet ta' statistika (eż. analiżi ta' varjanza, analiżi ta' rigressjoni).

14. Il-fażi ta' eliminazzjoni tikkonsisti fit-trasferiment tal-organiżmi tat-test għal reċipjenti li jkun fihom l-istess substrat mingħajr il-kimika għall-ittestjar. Matul il-fażi ta' eliminazzjoni, jittieħdu kejlijiet f'ħinijiet ta' teħid ta' kampjuni matul 14-il jum (enchytraeids) jew 21 jum (ħniex) sakemm determinazzjoni analitika ta' qabel tkun uriet tnaqqis ta' 90 % tar-residwi tal-kimika għall-ittestjar f'dud. Il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fid-dud fit-tmiem tal-fażi ta' eliminazzjoni tkun irrapportata bħala residwi

▼M4

mhux eliminati. Il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika tal-istat regolari (BAFss) ikun ikkalkulat preferibbilment kemm bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjoni f'dud (Ca) kif ukoll fil-ħamrija (Cs) fi stat regolari apparenti, u bħala fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika, BAFK, bħala l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' assorbiment mill-ħamrija (ks) u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (ke) (ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet) jekk wieħed jassumi kinetika tal-ewwel ordni (ara l-Appendiċi 2 għal kalkulazzjonijiet). Jekk kinetika tal-ewwel ordni ovvjament ma tkunx applikabbli, għandhom jintużaw mudelli oħra.

15. Il-kostant tar-rata ta' assorbiment, il-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (jew kostanti, fejn kienu involuti mudelli oħra), il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika (BAFK), u meta jkun possibbli, il-limiti ta' kunfidenza ta' kull wieħed minn dawn il-parametri jkunu kkalkulati minn ekwazzjonijiet mudelli kompjuterizati (ara l-Appendiċi 2 għal gwida). L-idoneità ta' kull mudell tista' tkun iddeterminata minn eż. il-koeffiċjent ta' korrelazzjoni jew mill-koeffiċjent ta' determinazzjoni (koeffiċjenti qrib ta' wieħed jindikaw idoneità) jew chi-kwadrat. Id-daqs ukoll tal-iżball standard jew il-limitu ta' kunfidenza madwar il-parametri stmati jistgħu jkunu indikattivi tal-idoneità tal-mudell.

16. Biex titnaqqas il-varjabbiltà f'riżultati ta' testijiet għal kimiċi għall-ittestjar b'lipofiliċità għolja, fatturi ta' akkumulazzjoni bijoloġika għandhom ikunu espressi b'rabta mal-kontenut ta' lipidi u mal-kontenut ta' karbonju organiku (kg ta' karbonju organiku ta' ħamrija (OC) kg-1 kontenut ta' lipidi ta' dud). Dan l-approċċ huwa bbażat fuq il-fatt li għal xi klassijiet ta' kimika, hemm relazzjoni ċara bejn il-potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika u l-lipofiliċità; dan kien stabbilit sewwa għall-ħut (47). Hemm relazzjoni bejn il-kontenut ta' lipidi ta' ħut u l-akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimiċi bħal dawn. Għal organiżmi tal-qiegħ, instabu korrelazzjonijiet simili, eż. (30) (44). Bl-istess mod għal oligochaetes terrestri ntweriet din il-korrelazzjoni, eż. (5) (6) (7) (14). Jekk ikun disponibbli tessut suffiċjenti ta' dud, il-kontenut ta' lipidi tal-annimali tat-test jista' jkun iddeterminat fuq l-istess materjal bijoloġiku bħal dak użat biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar. Alternattivament, jistgħu jintużaw annimali ta' kontroll biex jitkejjel il-kontenut ta' lipidi.

VALIDITÀ TAT-TEST

17. Biex test ikun validu għandhom jitħarsu l-kriterji li ġejjin kemm għal kontrolli kif ukoll għal trattamenti:

— Fit-tmiem tat-test, il-mortalità globali matul assorbiment u l-faża ta' eliminazzjoni m'għandhomx ikunu aktar minn 10 % (ħniex) jew 20 % (enchytraeids) tal-għadd totali tad-dud introdott.

— Għal *Eisenia fetida* u *Eisenia andrei*, it-telf medju ta' massa kif imkejjel fit-tmiem tal-assorbiment u fit-tmiem tal-faża ta' eliminazzjoni m'għandux ikun aktar minn 20 % mqabbel mal-piż ġdid inizjali (f.w.) fil-bidu ta' kull faża.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Speċi tat-test

18. Diversi speċijiet ta' oligochaetes terrestri huma rrakkomandati għal ittestjar ta' akkumulazzjoni bijoloġika. L-ispeċijiet komunement l-aktar użati Eisenia fetida jew Eisenia andrei (Lumbricidae), jew Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus, jew Enchytraeus luxuriosus (Enchytraeidae)) huma deskritti fl-Appendiċi 5.

▼M4

Apparat

19. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat l-użu ta' materjali, għall-partijiet kollha tat-tagħmir, li jistgħu jinħallu, jassorbixxu l-kimika għall-ittestjar jew ilissu kimiċi oħra, u jkollhom effett ħażin fuq l-annimali tat-test. Reċipjenti standard rettangolari jew ċilindriċi, magħmulin minn materjal kimikament inerti u ta' kapaċità adatta jistgħu jintużaw b'konformità mar-rata ta' tagħbija, jiġifieri mal-għadd ta' dud tat-test. Jistgħu jintużaw azzar inossidabbli, plastik jew ħġieġ għal kull tagħmir li jkollu kuntatt mal-midja tat-test. It-reċipjenti tat-test għandhom ikunu mgħottijin kif jixraq biex id-dud ma jitħalliex jaħrab, filwaqt li titħalla provvista suffiċjenti ta' arja. Għal kimiċi b'koeffiċjenti għoljin ta' sorbiment, bħal piretrojdi sintetiċi, jista' jkun meħtieġ ħġieġ sinalizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet it-tagħmir ikollu jitwarrab wara li jintuża (49). Oġġetti tat-test u kimiċi volatili b'tikketta radju m'għandhomx jitħallew jaħarbu. Għandhom ikunu użati sifuni (eż. fliexken tal-ħġieġ għal ħasil bil-gass) li jkun fihom assorbenti adatti biex iżommu kull residwu milli jevapora mir-reċipjenti tat-test.

Ħamrija

20. Il-ħamrija tat-test għandha tkun ta' kwalità li tippermetti s-sopravivenza u preferibbilment ir-riproduzzjoni tal-organiżmi tat-test għal kemm idumu l-akklimatazzjoni u l-perjodi ta' testijiet mingħajr dawn ma juru ebda dehra jew mġiba mhux normali. Id-dud għandu jħaffer toqob fil-ħamrija.

21. Il-ħamrija artifiċjali deskritta fil-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness (48) hija rrakkomandata biex tintuża bħala s-substrat fit-testijiet. It-tħejjija tal-ħamrija artifiċjali għal użu fit-testijiet ta' akkumulazzjoni bijoloġika u rakkomandazzjonijiet għall-ħżin ta' ħamrija artifiċjali jingħataw fl-Appendiċi 4. Ħamrija artifiċjali mnixxfa bl-arja tista' tinħażen f'temperatura ambjentali sakemm tintuża.

22. Iżda ħamrija naturali minn siti mhux imniġġsa tista' sservi ta' ħamrija ta' test u/jew ta' kultura. Ħamrija naturali għandha tkun ikkaratterizzata mill-anqas minn oriġni (sit ta' ġbir), pH, kontenut ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partiċelli (perċentwali ta' ramel, fajd u tafal), kapaċità ta' żamma massima ta' ilma (WHCmax), u kontenut ta' ilma f'perċentwali (3). Analiżi tal-ħamrija jew tal-kostitwenti tagħha għal mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu għandha tipprovdi informazzjoni utli. Jekk tintuża ħamrija minn għelieqi ta' art agrikola, m'għandhiex tkun ġiet ittrattata bi prodotti ta' protezzjoni ta' għelejjel jew b'demel ta' annimali ttrattati bħala fertilizzanti għal mill-anqas sena u b'fertilizzanti organiċi għal mill-anqas sitt xhur qabel ma jittieħdu kampjuni (50). Proċeduri ta' manipulazzjoni għal ħamrija naturali qabel ma tintuża f'tests ekotossikoloġiċi ma' oligochaetes fil-laboratorju huma deskritti fi (3). Għal ħamrija naturali ż-żmien ta' ħżin fil-laboratorju għandu jinżamm qasir kemm jista' jkun.

Applikazzjoni tal-kimika għall-ittestjar

23. Il-kimika għall-ittestjar tkun inkorporata fil-ħamrija. Għandhom jitqiesu l-proprjetajiet fiżikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar. Kimika għall-ittestjar li tinħall fl-ilma għandha tiġi maħlula kompletament fl-ilma qabel ma titħallat mal-ħamrija. Il-proċedura rrakkomandata li tiffortifika għal kimika għall-ittestjar li ftit tinħall fl-ilma tinvolvi kisja waħda jew aktar tal-kostitwenti tal-ħamrija (artifiċjali) mal-kimika għall-ittestjar. Pereżempju, ir-ramel tal-quartz, jew porzjon minnu, jista' jitgħaddas b'soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'solvent organiku adatt, li wara jiġi evaporat bil-mod

▼M4

sakemm jinxef. Il-frazzjoni miksija mbagħad tkun tista' titħallat fil-ħamrija mxarrba. Il-vantaġġ kbir ta' din il-proċedura huwa li ebda solvent ma jiddaħħal fil-ħamrija. Meta tintuża ħamrija naturali, il-kimika għall-ittestjar tista' tkun iffortifikata billi porzjon ta' ħamrija mnixxef bl-arja jitħallat kif deskritt hawn fuq għall-ħamrija artifiċjali, jew billi l-kimika għall-ittestjar titħawwad fil-ħamrija mxarrba, bi stadju wara ta' evaporazzjoni jekk jintuża aġent ta' solubilità. Inġenerali, il-kuntatt ta' ħamrija mxarrba ma' solventi għandu jkun evitat kemm jista' jkun. Għandu jitqies dan li ġej (3):

— Jekk jintuża solvent minbarra ilma, huwa għandu jkun wieħed li jitħallat mal-ilma u/jew li jkun jista' jitneħħa (pereżempju, evaporat), u titħalla biss il-kimika għall-ittestjar fuq il-ħamrija.

— Jekk jintuża kontroll ta' solvent, ma jkunx hemm ħtieġa ta' kontroll negattiv. Il-kontroll ta' solvent għandu jkun fih 'il fuq mill-ogħla konċentrazzjoni ta' solvent miżjud mal-ħamrija u għandu juża solvent mill-istess lott użat biex issir is-soluzzjoni ta' stokkijiet. It-tossiċità u l-volatilità tas-solvent, u s-solubilità tal-kimika għall-ittestjar fis-solvent magħżul għandhom ikunu l-kriterji ewlenin użati għall-għażla ta' aġent ta' solubilità adatt.

24. Għal kimiċi li ftit jinħallu fl-ilma u f'solventi organiċi, jistgħu jitħalltu 2,0 – 2,5 g ta' ramel quartz miftħun fin għal kull reċipjent tat-test mal-kwantità ta' kimika għall-ittestjar, eż. billi jintuża mehrież u lida, biex tinkiseb il-konċentrazzjoni tat-test mixtieqa. Din it-taħlita ta' ramel tal-quartz u l-kimika għall-ittestjar jiżdiedu mal-ħamrija magħmula niedja minn qabel u mħawda sewwa b'ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut meħtieġ ta' rtuba. It-taħlita finali titqassam fir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tittenna għal kull konċentrazzjoni tat-test, u jitħejja wkoll kontroll xieraq b'2,0 – 2,5 g ta' ramel tal-quartz miftħun fin għal kull reċipjent tat-test.

25. Il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija għandha tkun iddeterminata wara li tkun ġiet iffortifikata. Id-distribuzzjoni omoġenja tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija għandha tkun ivverifikata qabel ma jiddaħħlu l-organiżmi tat-test. Il-metodu użat biex tkun iffortifikata, u r-raġunijiet għall-għażla ta' proċedura li tiffortifika għandhom ikunu rrapportati (24).

26. L-ekwilibriju bejn il-ħamrija u l-fażi ta' ilma mill-pori idealment għandha tkun stabbilita qabel ma jiżdiedu l-organiżmi; huwa rrakkomandat perjodu ta' żmien ta' erbat ijiem f'20 °C. Għal ħafna kimiċi organiċi li ftit jinħallu fl-ilma ż-żmien meħtieġ biex jintlaħaq ekwilibriju veru bejn frazzjonijiet sorbiti u maħlulin jistgħu jingħaddu f'jiem jew xhur. Ikun jiddependi mill-għan tal-istudju, pereżempju meta l-kondizzjonijiet ambjentali għandhom ikunu imitati, jekk il-ħamrija fortifikata tkunx tista' 'tixxejjaħ' għal perjodu itwal, eż. tliet ġimgħat għal metalli f'20 °C (22).

Kultura għall-organiżmi tat-test

27. Dud għandu preferibbilment jinżamm f'kultura permanenti tal-laboratorju. Gwida dwar metodi ta' kultura tal-laboratorju għal *Eisenia fetida* u *Eisenia andrei*, u għall-ispeċi ta' Enchytraeid, hija pprovduta fl-Appendiċi 5 (ara wkoll (48) (51) (52)).

28. Id-dud użat fit-testijiet għandu jkun ħieles minn mard, anormalitajiet u parassiti osservabbli.

PRESTAZZJONI TAT-TEST

29. L-organiżmi tat-test ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar matul il-fażi ta' assorbiment. Il-fażi ta' assorbiment għandha tkun ta' 14-il jum (enchytraeids) jew ta' 21 jum (ħniex) sakemm ma jintweriex li jkun intlaħaq stat regolari.

▼M4

30. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud ikun ittrasferit għal ħamrija ħielsa minn kimika għall-ittestjar. L-ewwel kampjun għandu jittieħed f'4 – 24 siegħa wara l-bidu tal-fażi ta' eliminazzjoni. Eżempji ta' skedi ta' teħid ta' kampjuni għal fażi ta' assorbiment ta' 21 jum u għal fażi ta' eliminazzjoni ta' 21 jum jingħataw fl-Appendiċi 3.

Organiżmi tat-test

31. Għal ħafna speċijiet ta' enchytraeids terresti l-piż ta' kull waħda minnhom huwa baxx ħafna (eż. 5-10 mg piż fl-imxarrab għal kull waħda minnhom ta' *Enchytraeus albidus* u anqas għal *Enchytraeus crypticus* jew *Enchytraeus luxuriosus*); biex isiru l-kejlijiet tal-piż u l-analiżi kimika, jista' jkun meħtieġ li jingħabar id-dud tar-reċipjenti replikati tat-test (jiġifieri jintuża d-dud kollu ta' reċipjent replikat biex jinkiseb riżultat ta' tessut analitiku wieħed). 20 enchytraeids individwali jiżdiedu għal kull replikat, u għandhom jintużaw mill-anqas tliet replikati. Jekk il-limitu analitiku ta' detezzjoni tal-kimika għall-ittestjar ikun għoli, jista' jkun meħtieġ aktar dud. Għal speċi tat-test b'piż ogħla ta' kull speċi waħidha (*Eisenia fetida* u *Eisenia andrei*), jistgħu jintużaw reċipjenti replikati li jkun fihom speċi waħda.

32. Il-ħniex użati f'test għandhom ikunu ta' piż simili (eż. *Eisenia fetida* u *Eisenia andrei* kull waħda minnhom għandu jkollha piż ta' 250 – 600 mg). Enchytraeids (eż. *Enchytraeus albidus*) għandu jkollhom tul ta' bejn wieħed u ieħor 1 cm. Id-dud kollu użat f'test partikolari għandu jiġi mill-istess sors, u għandhom ikunu annimali adulti bi clitellum (ara l-Appendiċi 5). Minħabba li l-piż u l-età ta' annimal jista' jkollhom effett fuq il-valuri tal-BAF (eż. minħabba kontenut ta' lipidi li jvarja u/jew għax ikun ħemm bajd), dawn il-parametri għandhom ikunu rreġistrati b'mod akkurat u jitqiesu fl-interpretazzjoni ta' riżultati. Barra minn dan, fosdqiet jistgħu jkunu ddepożitati matul il-perjodu ta' espożizzjoni, li jkollu wkoll impatt fuq il-valuri tal-BAF. Huwa rrakkomandat li kampjun sekondarju tad-dud tat-test jintiżen qabel it-test biex ikunu stmati l-piżijiet medji fl-imxarrab u fin-niexef.

33. Għandu jintuża proporzjon għoli ta' ħamrija ma' dud biex ikun imminimizzat it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija matul il-fażi ta' assorbiment. Għal *Eisenia fetida* u *Eisenia andrei* huwa rrakkomandat ammont minimu ta' piż fin-niexef ta' 50 g (d.w.) ta' ħamrija għal kull dudu, u għal enchytraeids, minimu ta' 10-20 g d.w. ta' ħamrija għal kull reċipjent tat-test. Ir-reċipjenti għandu jkun fihom saff ħamrija ta' 2-3 cm (enchytraeids) jew 4-5 cm (ħniex).

34. Id-dud użat f'test jitneħħa mill-kultura (eż. enchytraeids billi jintużaw pinzetti ta' ġojjellier). Annimali adulti jkunu ttrasferiti għal ħamrija tat-test mhux ittrattata għal akklimatazzjoni, u mitmugħa (ara l-paragrafu 36). Jekk il-kondizzjonijiet tat-test ikunu differenti mill-kondizzjonijiet tal-kultura, fażi ta' akklimatazzjoni ta' 24-72 siegħa għandha tkun sufiċjenti biex id-dud jadatta għall-kondizzjonijiet tat-test. Wara akklimatazzjoni, il-ħniex jitlaħalħu billi jkunu ttrasferiti għal dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet Petri) li jkun fihom ilma nadif, u wara jintiżnu qabel ma jiżdiedu mal-ħamrija tat-test. Qabel l-użin, għandu jitneħħa ilma żejjed mid-dud billi d-dud jintmess max-xifer tad-dixx jew ikun ixxugat bil-mod sakemm jinxef bl-użu ta' xugaman tal-karta ftit niedi.

35. Il-mod kif organismi tat-test iħaffru toqob għandu jkun osservat u rreġistrat. F'testijiet bi ħniex, l-annimali (kontroll u trattamenti) normalment itaqqbu toqob fil-ħamrija f'perjodu ta' ftit siegħat; dan għandu jkun ivverifikat mhux aktar tard minn 24 siegħa wara li jiżdied id-dud fir-reċipjenti tat-test. Jekk il-ħniex jonqsu milli jħaffru toqob fil-ħamrija (eż. aktar minn 10 % għal

▼M4

aktar min-nofs tal-fażi ta' assorbiment), dan jindika li jew il-kondizzjonijiet tat-test ma jkunux adatti jew li l-organiżmi tat-test ma jkunux f'saħħithom. F'każ bħal dan it-test għandu jitwaqqaf u jittenna. Enchytraeids jgħixu l-aktar fil-pori interstizjali tal-ħamrija, u sikwit il-qoxra ta' barra tagħhom tista' tkun parzjalment biss f'kuntatt mas-substrat tal-madwar; espożizzjoni ta' enchytraeids li jħaffru toqob u dawk li ma jħaffrux toqob tkun preżunta li hija ekwivalenti u enchytraeids li ma jħaffrux toqob mhux bilfors jeħtiġilhom li t-test jittenna.

Tmigħ

36. Tmigħ għandu jkun ipprospettat meta tintuża ħamrija b'kontenut ta' karbonju organiku totali baxx. Meta tintuża ħamrija artifiċjali, hija rrakkomandata rata ta' tmigħ darbtejn fil-ġimgħa (jiġifieri d-dud għandu jintema' darba fil-ġimgħa) ta' 7 mg ta' rawt niexef għal kull g ħamrija piż fin-niexef għal ħniex, u rata kull ġimgħa ta' 2-2,5 mg ta' trofof ta' ħafur miṫun għal kull g ħamrija piż fin-niexef għal enchytraeids (11). L-ewwel razzjon ta' ikel għandu jiṫħallat mal-ħamrija minnufih qabel ma' jiżdiedu l-organiżmi tat-test. Preferibbilment għandu jintuża l-istess tip ta' ikel bħal dak fil-kulturi (ara l-Appendiċi 5).

Dawl u temperatura

37. It-testijiet għandhom isiru taħt ċiklu kkontrollat ta' 16/8 sigħat dawl/dlam, preferibbilment ta' 400 sa 800 lx fl-erja tat-reċipjenti tat-test (3). It-temperatura tat-test għandha tkun 20 ± 2 °C matul it-test kollu.

Konċentrazzjonijiet tat-test

38. Tintuża konċentrazzjoni waħda. Sitwazzjonijiet fejn konċentrazzjoni(jiet) addizzjonali tkun/ikunu meħtieġa għandhom ikunu ġġustifikati. Jekk it-tossiċità (ECx) tal-kimika għall-ittestjar tkun qrib il-limitu ta' detezzjoni analitika, huwa rrakkomandat l-użu ta' kimika għall-ittestjar b'tikketta radju b'radjuattività speċifika għolja. Għal metalli, il-konċentrazzjoni għandha tkun 'il fuq mil-livell tal-isfond fit-tessut u fil-ħamrija.

Replikati

39. Għal kejlijiet kinetiċi (fażi ta' assorbiment u eliminazzjoni), l-għadd minimu ta' reċipjenti replikati ttrattati għandu jkun tlieta għal kull punt ta' teħid ta' kampjuni. L-għadd totali ta' replikati mhejjija għandu jkun suffiċjenti biex ikopri l-ħinijiet kollha ta' teħid ta' kampjuni matul l-assorbiment u l-fażi ta' eliminazzjoni.

40. Għall-osservazzjonijiet u l-kejl bijoloġiċi (eż. proporzjon ta' piż minn fin-niexef għal fl-imxarrab, kontenut ta' lipidi) u għall-analiżi ta' konċentrazzjonijiet ta' bażi f'dud u fil-ħamrija, għandhom ikunu pprovduti mill-anqas 12-il reċipjent replikat ta' kontroll negattiv (erbgħa li jkun itteħdilhom kampjun fil-bidu, erbgħa fit-tmiem ta' assorbiment, u erbgħa fit-tmiem ta' eliminazzjoni) jekk ma jkun użat ebda solvent minbarra ilma. Jekk jintuża xi aġent ta' solubilità għall-applikazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, għandu jsir kontroll ta' solvent (erbgħa reċipjenti replikati għandu jitteħdilhom kampjun fil-bidu, erbgħa fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment u erbgħa fit-tmiem tal-fażi ta' eliminazzjoni) li jkun fih il-kostitwenti kollha ħlief għal oġġett tat-test flimkien mar-replikati ttrattati. F'dan il-każ, jistgħu wkoll ikunu pprovduti erbgħa reċipjenti replikati addizzjonali ta' kontroll negattiv (ebda solvent) għal teħid fakultattiv ta' kampjuni fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment. Dawn ir-replikati jistgħu jitqabblu bijoloġikment mal-kontroll ta' solvent biex tinkiseb informazzjoni dwar influwenza li jista' jkun hemm tas-solvent fuq l-organiżmi tat-test. Huwa rrakkomandat li jkun stabbilit għadd suffiċjenti ta' reċipjenti replikati riżervati addizzjonali (eż. tmienja) għal trattament u kontroll(i).

▼M4

Frekwenza ta' kejl tal-kwalità tal-ħamrija

41. Il-pH tal-ħamrija, il-kontenut ta' rtuba fil-ħamrija u t-temperatura (kontinwament) fil-kamra tat-test għandhom jitkejlu fil-bidu u fit-tmiem tal-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Darba fil-ġimgħa l-kontenut ta' rtuba fil-ħamrija għandu jkun ikkontrollat billi jintiżnu r-reċipjenti tat-test u l-piżijiet attwali jitqabblu ma' piżijiet inizjali fil-bidu tat-test. Telf ta' ilma għandu jkun ikkumpensat biż-żieda ta' ilma dejonizzat.

Teħid ta' kampjuni u analiżi ta' dud u ta' ħamrija

42. Eżempju ta' skeda għall-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni f'testijiet ta' akkumulazzjoni bijoloġika ta' ħniex u enchytraeid tingħata fl-Appendiċi 3.

43. Il-ħamrija jitteħdilha kampjun mir-reċipjenti tat-test biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar qabel ma jiddaħħal id-dud, u matul il-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Matul it-test il-konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar ikunu ddeterminati fid-dud u fil-ħamrija. Inġenerali, konċentrazzjonijiet totali ta' ħamrija jitkejlu. B'mod fakultattiv, konċentrazzjonijiet f'ilma tal-pori jistgħu jitkejlu; f'każ bħal dan, għandhom ikunu pprovduti motiv u metodi adatti qabel ma jinbeda studju, u jkunu inklużi fir-rapport.

44. Id-dud u l-ħamrija jitteħdulhom kampjun mill-anqas f'sitt okkażjonijiet matul il-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Jekk tintwera l-istabbiltà ta' kimika għall-ittestjar, l-għadd ta' analiżi tal-ħamrija jista' jitnaqqas. Huwa rrakkomandat li ssir analiżi mill-anqas ta' tliet replikati fil-bidu u fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment. Jekk il-konċentrazzjoni fil-ħamrija mkejla fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment tmur lil hinn mill-konċentrazzjoni tal-bidu b'aktar minn 30 %, il-kampjuni tal-ħamrija meħudin f'dati oħra wkoll għandhom ikunu analizzati.

45. Neħħi d-dud ta' replikat partikolari mill-ħamrija f'kull ħin ta' teħid ta' kampjuni (eż. wara li tkun ferrixt il-ħamrija tar-replikat f'dixx baxx u erfajt id-dud bl-użu ta' pinzetti rotob tal-ġojjellier), laħlaħhom malajr bl-ilma f'dixx baxx tal-ħġieġ jew tal-azzar. Neħħi ilma żejjed (ara l-paragrafu 34). Ittrasferixxi d-dud b'attenzjoni għal ġo reċipjent li jkun intiżen minn qabel, iżinhom fil-pront, inkluż il-kontenut tal-imsaren.

46. Il-ħniex (*Eisenia* sp.) għandhom imbagħad jitħallew inaddfu msarinhom matul l-lejl eż. fuq filtru niedi tal-karta f'dixx Petri mgħotti (ara l-paragrafu 34). Wara t-tindif, il-piż tad-dud għandu jkun iddeterminat biex ikun ivvalutat tnaqqis jekk jista' jkun fil-bijomassa matul it-test (ara l-kriterji tal-validità fil-paragrafu 17). Użin u analiżi ta' tessut ta' Enchytraeids isir mingħajr tindif, għax dan huwa teknikament diffiċli minħabba d-daqs żgħir ta' dan id-dud. Wara determinazzjoni finali tal-piż, id-dud għandu jinqatel minnufih, billi jintuża l-metodu l-aktar adatt (eż. billi jintuża nitroġenu likwidu, jew iffriżar taħt -18 °C).

47. Matul il-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud jissostitwixxi kontenut ta' msaren kontaminati b'ħamrija nadifa. Dan ifisser li kejlijiet ta' dud mhux nadif (enchytraeids f'dan il-kuntest) li jkun iteħidlu kampjun minnufih qabel il-fażi ta' eliminazzjoni jinkludi ħamrija b'imsaren kontaminati. Għal oligochaetes akwatiċi huwa preżunt li wara 4 – 24 siegħa inizjali tal-fażi ta' eliminazzjoni, il-kontenut kważi kollu ta' msaren kontaminati jkun ġie sostitwit b'sediment nadif, eż. (46). Sejbiet simili kienu rrapportati għal ħniex fi studji dwar l-akkumulazzjoni ta' kadmju u żingu b'tikketta radju (78). F'enchytraeids mhux imnaddfin, il-konċentrazzjoni ta' dan l-ewwel kampjun tal-fażi ta' eliminazzjoni tista' titqies bħala l-konċentrazzjoni ta' tessuti wara t-tindif ta' msaren. Biex titqies id-dilwizzjoni tal-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test b'ħamrija mhux kontaminata matul l-fażi ta' eliminazzjoni, il-piż tal-kontenut ta' msaren jista' jkun stmat mill-piż ta' dud fl-imxarrab/piż ta' rmied ta' dud jew piż ta' dud fin-niexef/proporzjonijiet ta' piżijiet ta' rmied tad-dud.

▼M4

48. Il-kampjuni tal-ħamrija u d-dud għandhom preferibbilment ikunu analizzati minnufih wara tneħħija (jiġifieri f'1-2 ijiem) biex ma jitħalliex ikun hemm degradazzjoni jew telf ieħor, u huwa rrakkomandat li jkunu kkalkulati r-rati approssimattivi ta' assorbiment u eliminazzjoni hekk kif ikun għaddej it-test. Jekk l-analiżi tiddewwem, il-kampjuni għandhom jinħażnu b'metodu adatt, eż. fil-friża (≤ -18 °C).

49. Għandu jkun ivverifikat li l-preċiżjoni u riproduċibbiltà tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-ħamrija u mill-kampjuni tad-dud ikunu sodisfaċenti għall-metodu mogħti; l-effiċjenza ta' estrazzjoni, il-limitu ta' detezzjoni (LOD) u l-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) għandhom ikunu rrapportati. Bl-istess mod għandu jkun ivverifikat li l-kimika għall-ittestjar ma tkunx tista' tinqabad fir-reċipjenti ta' kontroll f'konċentrazzjonijiet ogħla minn ta' sfond. Meta l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-organiżmu tat-test Ca tkun > 0 fid-dud ta' kontroll, din għandha tkun inkluża fil-kalkulazzjoni tal-parametri kinetiċi (ara l-Appendiċi 2). Il-kampjuni kollha għandhom ikunu ttrattati matul it-test kollu biex ikunu mminimizzati l-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw minn sorbiment tal-kimika għall-ittestjar fuq l-apparat ta' teħid ta' kampjuni).

50. Meta jsir xogħol fuq kimiċi għall-ittestjar b'tikketta radju, ikun possibbli ssir analiżi ta' kimiċi prinċipali u metaboliti. Kwantifikazzjoni ta' kimika prinċipali tat-test u metaboliti fi stat regolari jew fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment tipprovdi informazzjoni importanti. Il-kampjuni għandhom imbagħad 'jitnaddfu' biex il-kimika prinċipali tat-test tkun tista' tiġi kkwantifikata separatament. Jekk metabolita waħedha taqbeż 10 % tar-radjuattività totali fil-kampjun(i) analizzat(i), hija rrakkomandata l-identifikazzjoni ta' dawn il-metaboliti.

51. L-irkupru globali, u l-irkupru ta' kimika għall-ittestjar f'dud, fil-ħamrija, u jekk jintużaw, f'sifuni li jkun fihom assorbenti biex iżommu kimika għall-ittestjar evaporata, għandhom ikunu rreġistrati u rrapportati.

52. Il-ġbir flimkien ta' dawk li jitneħdilhom kampjun minn reċipjent partikolari tat-test huwa aċċettabbli għal dud enchytraeid li jkunu iżgħar mill-ħniex. Jekk ġbir ikun jinvolvi t-tnaqqis tal-għadd ta' replikati, dan jillimita l-proċeduri ta' statistika li jistgħu jkunu applikati għad-dejta. Jekk ikunu meħtieġa proċedura u poter speċifiċi ta' statistika, f'dak il-każ għandu jkun inkluż għadd adegwat ta' reċipjenti replikati tat-test fit-test biex jakkomoda l-ġbir, il-proċedura u l-poter mixtieqa.

53. Huwa rrakkomandat li l-BAF ikun espress kemm bħala funzjoni ta' piż totali fin-niexef, kif ukoll, meta meħtieġ (jiġifieri għal kimiċi idrofobiċi ħafna), bħala funzjoni tal-kontenut ta' lipidi. Għandhom jintużaw metodi adatti għad-determinazzjoni ta' kontenut ta' lipidi (xi metodi li jeżistu diġà – eż. (31) (58) – għandhom ikunu adattati għal dan il-fini). Dawn il-metodi jużaw teknika ta' estrazzjoni tal-kloroform/metanol. Iżda biex ikun evitat l-użu ta' solventi bil-klorur, għandha tintuża modifika tal-metodu ta' Bligh u Dyer (9) kif deskritta fi (17). Minħabba li d-diversi metodi jistgħu ma jagħtux valuri identiċi, huwa importanti li jingħataw dettalji tal-metodu użat. Meta jkun possibbli, jiġifieri jekk ikun disponibbli tessut suffiċjenti tad-dud, l-analiżi tal-lipidi għandha idealment issir fuq l-istess kampjun jew estratt bħal dak użat għal analiżi tal-kimika għall-ittestjar, minħabba li l-lipidi sikwit ikollhom jitneħħew mill-estratt qabel ma jkunu jistgħu jiġu analizzati kromatografikament (49). Alternattivament, jistgħu jintużaw annimali ta' kontroll biex jitkejjel il-kontenut ta' lipidi, li mbagħad ikunu jistgħu jintużaw biex jinnormalizzaw valuri tal-BAF. Dan l-aħħar approċċ inaqqas il-kontaminazzjoni ta' tagħmir mal-kimika għall-ittestjar.

▼M4

DEJTA U RAPPURTAR

Trattament ta' riżultati

54. Il-kurva ta' assorbiment tal-kimika għall-ittestjar tinkiseb billi l-konċentrazzjoni tagħha tiġi mmarkata fi/fuq id-dud matul il-fażi ta' assorbiment mal-ħin fuq skali aritmetiċi. Meta l-kurva tkun laħqet livell kostanti jew stat regolari (ara d-definizzjonijiet fl-Appendiċi 1), il-fattur BAFss ta' akkumulazzjoni bijoloġika tal-istat regolari jkun ikkalkulat skont:

$$\frac{C_a \text{ fi stat regolari jew fi tmiem ta' fażi ta' assorbiment (medja)}}{C_s \text{ fi stat regolari jew fi tmiem ta' fażi ta' assorbiment (medja)}}$$

C_a huwa l-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fl-organiżmu tat-test

C_s huwa l-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fil-ħamrija

55. Meta ma jintlaħaq ebda stat regolari, il-BAFK, ibbażat fuq il-kostanti ta' rati, għandu jkun ikkalkulat minflok il-BAFss, kif deskritt hawn taħt:

— Iddetermina l-fattur ta' akkumulazzjoni (BAFK) bħala l-proporzjon k_s/k_e.

— Rati ta' assorbiment u eliminazzjoni preferibbilment ikunu kkalkulati simultanjament (ara l-Ekwazzjoni 11 fl-Appendiċi 2)

— Il-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) is-soltu jkun iddeterminat mill-kurva ta' eliminazzjoni (jiġifieri grafika tal-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test tad-dud matul il-fażi ta' eliminazzjoni). Il-kostant tar-rata ta' assorbiment k_s mbagħad ikun ikkalkulat skont ke u valur ta' C_a li jidderiva mill-kurva ta' assorbiment – ara l-Appendiċi 2 għal deskrizzjoni ta' dawn il-metodi. Il-metodu ppreferut biex jinkiseb BAF_K u l-kostanti tar-rati, k_s, u k_e, huwa li jintużaw metodi mhux lineari ta' stima ta' parametri fuq kompjuter. Jekk l-eliminazzjoni ovvjament ma tkunx tal-ewwel ordni, f'dak il-każ għandhom jintużaw mudelli aktar kumplessi.

Rapport tat-test

56. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

— Kull informazzjoni disponibbli dwar tossiċità akuta jew fit-tul (eż. EC_x, LC_x „ NOEC) tal-kimika għall-ittestjar għal oligochaetes li jgħixu fil-ħamrija;

— purezza, natura fiżika u proprjetajiet fiżikokimiċi, eż. log K_{ow}, solubilità tal-ilma;

— dejta ta' identifikazzjoni ta' kimiċi; sors tal-oġġett tat-test, identità u konċentrazzjoni ta' kull solvent użat;

— jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radju, il-pożizzjoni preċiża tal-atomi bit-tikketta, ir-radjuattività speċifika u l-purezza radjukimika.

Speċi tat-test:

— isem xjentifiku, razza, sors, kull trattament minn qabel, akklimatazzjoni, età, daqs-firxa, eċċ..

▼M4

Kondizzjonijiet tat-test:

— proċedura tat-test użat;

— tip u karatteristiċi ta' lluminazzjoni użati u fotoperjodu/i;

— disinn tat-test (eż. għadd u daqs ta' reċipjenti tat-test, massa ta' ħamrija u għoli ta' saff ta' ħamrija, għadd ta' replikati, għadd ta' dud għal kull replikat, għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test, durata ta' fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni, frekwenza ta' teħid ta' kampjuni);

— motiv għall-għażla tal-materjal tar-reċipjent tat-test;

— metodu ta' tħejjija u applikazzjoni ta' oġġett tat-test, kif ukoll raġunijiet għall-għażla ta' metodu speċifiku;

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test, u l-metodu li bih dawn il-valuri nkisbu;

— sors tal-kostitwenti tal-ħamrija artifiċjali jew – jekk jintużaw midja naturali – l-oriġni tal-ħamrija, deskrizzjoni ta' kull trattament minn qabel, riżultati tal-kontrolli (sopravivenza, żvilupp ta' bijomassa, riproduzzjoni), karatteristiċi tal-ħamrija (pH, kontenut totali ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partiċelli (perċentwali ta' ramel, fajd u tafal)), WHC_{max}, kontenut ta' ilma f'perċentwali fil-bidu u fit-tmiem tat-test, u kejlijiet oħra magħmulin);

— informazzjoni dettaljata dwar it-trattament ta' kampjuni tal-ħamrija u ta' dud, inklużi dettalji dwar tħejjija, ħżin, proċeduri ta' fortifikazzjoni, estrazzjoni u proċeduri analitiċi (u preċiżjoni) għall-oġġett tat-test f'dud u fil-ħamrija, u kontenut ta' lipidi (jekk imkejjel) u rkupri tal-oġġett tat-test.

Riżultati:

— mortalità tad-dud tal-kontroll u d-dud f'kull reċipjent tat-test u kull mġiba mhux normali osservata (eż., evitar ta' ħamrija, nuqqas ta' riproduzzjoni f'test ta' akkumulazzjoni bijoloġika b'enchytraeids);

— il-proporzjon ta' piż fin-niexef għal piż fl-imxarrab tal-ħamrija u l-organiżmi tat-test (utli għal normalizzazzjoni);

— il-piżijiet fl-imxarrab tad-dud waqt li jkunu qed jittieħdu kampjuni; għal ħniex, il-piżijiet fl-imxarrab fil-bidu tat-test u f'kull żmien ta' teħid ta' kampjuni qabel u wara tindif ta' msaren;

— il-kontenut ta' lipidi tal-organiżmi tat-test (jekk determinati);

— kurvi, li juru l-kinetika ta' assorbiment u eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fid-dud, u ż-żmien għal stat regolari;

— C_a u C_s (b'devjazzjoni u firxa standard, jekk ikun jixraq) għaż-żmijiet kollha ta' teħid ta' kampjuni (C_a espressa f'g kg^{-1} piż fl-imxarrab u fin-niexef tal-korp kollu, C_s espressa f'g kg^{-1} piż fl-imxarrab u fin-niexef ta' ħamrija). Jekk ikun meħtieġ fattur ta' akkumulazzjoni bijota-ħamrija (BSAF) (eż. għal tqabbil ta' riżultati minn żewġ testijiet jew aktar magħmulin fuq annimali ta' kontenut differenti ta' lipidi), C_a tista' addizzjonalment tkun espressa bħala g kg^{-1} ta' kontenut ta' lipidi tal-organiżmu, u C_s tista' tkun espressa bħala g kg^{-1} ta' karbonju organiku (OC) tal-ħamrija;

— BAF (espress f'kg ta' ħamrija kg^{-1} ta' dud), kostant k_s tar-rata ta' assorbiment ta' ħamrija (espress f'g ta' kg^{-1} ta' ħamrija ta' jum^{-1} ta' dud), u kostant ke tar-rata ta' eliminazzjoni k_e (espressa f'jum^{-1}); BSAF (espress f'kg ta' ħamrija ta' OC kg^{-1} kontenut ta' lipidi ta' dud) jistgħu jkunu rrapportati addizzjonalment;

▼M4

— jekk imkejjel: perċentwali ta' kimika prinċipali, metaboliti, u residwi magħqudin (jiġifieri l-perċentwali ta' kimika għall-ittestjar li ma tistax tkun estratta b'metodi komuni ta' estrazzjoni) misjuba fil-ħamrija u annimali tat-test;

— metodi użati għall-analiżi ta' statistika ta' dejta.

Evalwazzjoni ta' riżultati:

— konformità tar-riżultati mal-kriterji ta' validità kif elenkati fil-paragrafu 17;

— riżultati mhux mistennija jew mhux tas-soltu, eż. eliminazzjoni mhux kompleta tal-kimika għall-ittestjar mill-annimali tat-test.

LETTERATURA:

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1 000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tal-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għall-kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standard-isierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Jista' jitniżżel minn: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Kanada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumu-lation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità għal Ħniex

(49) Il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness: Konċentrazzjoni bijoloġika: flow-through fish test.

(50) Il-Kapitolu C.21 ta' dan l-Anness: Mikroorganiżmi tal-Ħamrija: Test ta' Trasformazzjoni ta' Nitroġenu.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) Oecd (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.

▼M4

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Akkumulazzjoni bijoloġika hija ż-żieda f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fi jew fuq organiżmu relattiv għall-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-midjum tal-madwar. Riżultati ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn proċessi kemm ta' konċentrazzjoni bijoloġika kif ukoll ta' tkabbir bijoloġiku (ara hawn taħt).

Konċentrazzjoni bijoloġika hija ż-żieda f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fi jew fuq organiżmu, li tirriżulta mill-assorbiment tal-kimika esklussivament mill-midjum tal-madwar (jiġifieri permezz tal-wiċċ tal-ġisem u ħamrija li tkun iddaħħlet), relattiv għall-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-midjum tal-madwar.

Tkabbir bijoloġiku huwa ż-żieda f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fi jew fuq organiżmu, li jirriżulta l-aktar minn assorbiment minn ikel jew priża kontaminati, relattiv għall-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-ikel jew fil-priża. Tkabbir bijoloġiku jista' jwassal għal trasferiment jew akkumulazzjoni tal-oġġett tat-test f'siti elettroniċi tal-ikel.

L-**eliminazzjoni** ta' kimika għall-ittestjar hija t-telf ta' din il-kimika mit-tessut tal-organiżmu tat-test bi proċessi attivi jew passivi li jseħħu indipendentement minn jekk ikun hemm jew ma jkunx hemm l-oġġett tat-test fil-midjum tal-madwar.

Il-**fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika** (BAF) f'kull żmien matul il-faži ta' assorbiment ta' dan it-test ta' akkumulazzjoni bijoloġika huwa l-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fi/fuq l-organiżmu tat-test (C_a fi $g \cdot kg^{-1}$ piż fin-niexef tad-dudu) diviż bil-konċentrazzjoni tal-kimika fil-midjum tal-madwar (C_s bħala $g \cdot kg^{-1}$ tal-piż fin-niexef tal-ħamrija); il-BAF għandu l-unitajiet ta' kg ħamrija$\cdot kg^{-1}$ dudu.

Il-**fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika** ta' stat regolari (BAF_{ss}) huwa l-BAF fi stat regolari u ma jitbiddilx b'mod sinifikanti tul perjodu prolongat ta' żmien, bil-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-midjum tal-madwar (C_s bħala $g.kg^{-1}$ tal-piż fin-niexef tal-ħamrija) tkun kostanti matul dan il-perjodu ta' żmien.

Fatturi ta' akkumulazzjoni bijoloġika kkalkulati direttament mill-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' assorbiment ta' ħamrija u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_s u k_e, ara hawn taħt) jissejħu fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika (BAF_K).

Il-**fattur ta' akkumulazzjoni bijota-ħamrija** (BSAF) huwa l-konċentrazzjoni normalizzata b'lipidi tal-kimika għall-ittestjar fi/fuq l-organiżmu tat-test diviża bil-konċentrazzjoni organika normalizzata bil-karbonju tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija fi stat regolari. C_a huwa mbagħad espress bħala kontenut ta' lipidi $g \cdot kg^{-1}$ tal-organiżmu, u C_s bħala konenut organiku $g \cdot kg^{-1}$ tal-ħamrija; il-BSAF għandu l-unitajiet ta' lipidi kg $OC \cdot kg^{-1}$.

Livell kostanti jew **stat regolari** huwa ddefinit bħala l-ekwilibriju bejn il-proċessi ta' assorbiment u ta' eliminazzjoni li jseħħ fl-istess waqt matul il-faži ta' espożizzjoni. L-istat regolari jintlaħaq fil-grafika ta' BAF mal-ħin meta l-kurva tiġi parallela mal-assi tal-ħin u tliet analiżi ta' BAF wara xulxin magħmulin fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' mill-anqas jumejn ikunu qrib 20 % waħda mill-oħra, u ma jkunx hemm differenzi sinifikanti ta' statistika fost it-tliet perjodi ta' teħid ta' kampjuni. Għal kimiċi għall-ittestjar li jkunu kkunsmati bil-mod, intervalli aktar adatti jkunu ta' sebat ijiem (49).

Il-**koeffiċjent ta' partizzjoni organika karbonju-ilma** (K_{oc}) huwa l-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' kimika fi/fuq il-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-kimika fl-ilma f'ekwilibriju.

Il-**koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma** (K_{ow}) huwa l-proporzjon ta' solubilità ta' kimika f'n-ottanol u f'ilma f'ekwilibriju, espress ukoll xi drabi bħala P_{ow}. Il-logaritmu ta' K_{ow} (log K_{ow}) jintuża bħala indikazzjoni tal-potenzjal ta' kimika għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organiżmi akwatiċi.

▼**M4**

Il-**faża ta' assorbiment jew ta' espożizzjoni** hija l-ħin li matulu l-organiżmi tat-test ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar.

Il-**kostant tar-rata ta' assorbiment ta' ħamrija** (k_s) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' żieda fil-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fi/fuq l-organiżmu tat-test li jirriżulta minn assorbiment mill-faża tal-ħamrija. k_s huwa espress f'g ħamrija kg^{-1} ta' dudu d^{-1}.

Il-**faża ta' eliminazzjoni** hija l-ħin, wara t-trasferiment tal-organiżmi tat-test minn midjum kontaminat għal midjum ħieles mill-oġġett tat-test, li matulha tkun studjata l-eliminazzjoni (jew it-telf nett) tal-kimika mill-organiżmi tat-test.

Il-**kostant tar-rata ta' eliminazzjoni** (k_e) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fi/fuq l-organiżmu tat-test, wara t-trasferiment tal-organiżmi tat-test minn midjum li jkun fih l-oġġett tat-test għal midjum ħieles minn kimiċi; k_e hija espressa f'd^{-1}.

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼M4

Appendiċi 2

Kalkulazzjoni ta' parametri ta' assorbiment u eliminazzjoni

Il-punt ta' tmiem ewlieni ta' test ta' akkumulazzjoni bijoloġika huwa l-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika, BAF. Il-BAF imkejjel jista' jiġi kkalkulat bid-diviżjoni tal-konċentrazzjoni fl-organiżmu tat-test, C_a, bil-konċentrazzjoni fil-ħamrija, C_s, fi stat regolari. Jekk l-istat regolari ma jintlaħaqx matul il-fażi ta' espożizzjoni, il-BAF_K ikun ikkalkulat mill-kostanti ta' rati minflok minn BAFss. Iżda għandu jkun innotat jekk il-BAF ikunx ibbażat fuq konċentrazzjonijiet ta' stati uniformi jew le.

Il-mezzi tas-soltu għall-kisba tal-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika (BAF_K), il-kostant tar-rata ta' assorbiment ta' ħamrija (k_s) u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) huwa li jintużaw metodi ta' stima ta' parametri mhux lineari b'kompjuter, eż., ibbażati fuq il-mudelli deskritti f'(68). Mogħti sett ta' dejta ta' konċentrazzjoni ta' sekwenza ta' ħin u l-ekwazzjonijiet mudell:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 1]}$$

jew

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 2]}$$

fejn:

C_a = konċentrazzjoni ta' kimika f'dud [g kg-1 piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_s = kostant tar-rata ta' assorbiment f'tessut [g ħamrija kg-1 ta' dudu d-1]

C_s = konċentrazzjoni ta' kimika fil-ħamrija [g kg-1 ta' piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_e = kostant tar-rata ta' eliminazzjoni [d-1]

t_c = ħin fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment,

dawn il-programmi tal-kompjuter jikkalkulaw valuri għal BAF_K, k_s u k_e.

Meta l-konċentrazzjoni ta' bażi fid-dud mhux espost, eż. fil-jum 0 tkun differenti b'mod sinifikanti minn żero (dan jista' pereżempju jkun il-każ għal metalli), din il-konċentrazzjoni ta' bażi ($C_{a,0}$) għandha tkun inkluża f'dawn l-ekwazzjonijiet, biex isiru jaqraw:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 3]}$$

u

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 4]}$$

F'każijiet fejn ikun osservat tnaqqis sinifikanti tal-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-ħamrija tul il-ħin matul il-fażi ta' assorbiment, jistgħu pereżempju jintużaw il-mudelli li ġejjin (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[ekwazzjoni 5]}$$

▼M4

fejn:

C_s = konċentrazzjoni ta' kimika fil-ħamrija [g kg-1 piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_0 = kostant ta' rata ta' degradazzjoni fil-ħamrija [d-1]

C_0 = konċentrazzjoni inizjali tal-kimika fil-ħamrija [g kg-1 ta' piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 7]}$$

fejn:

C_a = konċentrazzjoni ta' kimika f'dud [g kg-1 piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_s = kostant tar-rata ta' assorbiment f'tessut [g ħamrija kg-1 ta' dudu d-1]

k_0 = kostant ta' rata ta' degradazzjoni fil-ħamrija [d-1]

k_e = kostant tar-rata ta' eliminazzjoni [d-1]

t_c = ħin fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment,

Meta jintlaħaq stat regolari matul il-fażi ta' assorbiment (jiġifieri t = ∞), ekwazzjoni 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ekwazzjoni 1]}$$

tista' titnaqqas għal:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

jew

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[ekwazzjoni 8]}$$

F'liema każ k_s/k_e x C_s ikun approċċ għall-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fit-tessut tad-dud fi stat regolari ($C_{a,ss}$).

Il-fattur ta' akkumulazzjoni bijota-ħamrija (BSAF) jista' jkun ikkalkulat kif ġej:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[ekwazzjoni 9]}$$

fejn f_{oc} huwa l-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' ħamrija, u f_{lip} huwa l-frazzjoni ta' lipidi ta' dud, it-tnejn preferibbilment iddeterminati minn kampjuni meħudin mit-test, u bbażati jew fuq piż fin-niexef jew fuq piż fl-imxarrab, rispettivament.

Il-kinetika ta' eliminazzjoni tista' tkun immudellata bl-użu tad-dejta mill-fażi ta' eliminazzjoni u bl-applikazzjoni tal-ekwazzjoni mudell u metodu ta' stima ta' parametri mhux lineari b'bażi tal-kompjuter li ġejjin. Jekk il-punti tad-dejta mmarkati mal-ħin jindikaw tnaqqis esponenzjali kostanti tal-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fl-annimali, ikun jista' jintuża mudell ta' kompartiment wieħed (ekwazzjoni 9) biex jiddeskrivi l-perkors tal-ħin ta' eliminazzjoni.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[ekwazzjoni 10]}$$

▼**M4**

Proċessi ta' eliminazzjoni xi drabi jidhru li jkunu ta' żewġ fażijiet, li juru tnaqqis mgħaġġel ta' C_a matul il-fażijiet bikrija, li jinbidel għal telf aktar bil-mod ta' oġġetti tat-test fil-fażijiet ta' wara tal-eliminazzjoni, eż. (27) (68). Iż-żewġ fażijiet jistgħu jkunu interpretati billi wieħed jassumi li jkun hemm żewġ kompartimenti differenti fl-organiżmu, li minuu l-oġġett tat-test jintilef b'veloċitajiet differenti. F'dawn il-każijiet, għandha tkun studjata letteraura speċifika, eż. (38) (39) (40) (78).

Bl-użu tal-ekwazzjonijiet mudelli ta' hawn fuq, il-parametri kinetiċi (k_s u k_e) jistgħu wkoll ikunu kkalkulati b'operazzjoni waħda bl-applikazzjoni fl-istess waqt tal-mudell ta' kinetika tal-ewwel grad għad-dejta kollha mill-fażi kemm ta' assorbiment, kif ukoll ta' eliminazzjoni. Għal deskrizzjoni ta' metodu li jista' jippermetti kalkulazzjoni konġunta bħal din ta' kostanti ta' rata ta' assorbiment u eliminazzjoni, jistgħu jkunu kkonsultati r-referenzi, (181), (213) u (210).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[ekwazzjoni 11]}$$

Nota: Meta parametri ta' assorbiment u eliminazzjoni jkunu stmati fl-istess waqt mid-dejta konġunta ta' assorbiment u eliminazzjoni, "m" kif tidher fl-ekwazzjoni 11 hija deskrittriċi li tħalli lill-programm tal-kompjuter jassenja t-termini sekondarji tal-ekwazzjoni lis-settijiet ta' dejta tal-fażi rispettiva u li jagħmel l-evalwazzjoni b'mod korrett (m = 1 għal fażi ta' assorbiment; m = 2 għal fażi ta' eliminazzjoni).

Madankollu, dawn l-ekwazzjonijiet mudelli għandhom jintużaw b'kawtela, l-aktar meta bidliet fid-disponibbiltà bijoloġika tal-kimika għall-ittestjar jew fid-degradazzjoni (bijoloġika) iseħħu matul it-test (ara eż. (79)).

▼M4

Appendiċi 3

EŻEMPJI TA' SKEDI GĦAL TESTIJIET TA' AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' ĦAMRIJA

Test tal-ħniex

(a) Faži ta' espożizzjoni bi 8 dati ta' teħid ta' kampjuni użati għal kalkulazzjoni ta' kinetika

Jum	Attività
– 6	Kondizzjonament tal-ħamrja mħejjija għal 48 siegħa;
– 4	Il-frazzjoni tal-ħamrija li tkun iffortifikata mas-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar; evaporizzazzjoni ta' kull solvent; taħlit tal-kostitwenti tal-ħamrija; distribuzzjoni tal-ħamrija mar-reċipjenti tat-test; ekwilibrazzjoni f'kondizzjonijiet tat-test għal 4 jiem (3 ġimgħat għal ħamrija fortifikata bil-metall);
– 3 sa – 1	Separazzjoni tal-organiżmi tat-test mill-kultura għal akklimatazzjoni; tħejjija u rtib tal-kostitwenti tal-ħamrija;
0	Kejl tat-temperatura, u l-pH tal-ħamrija; tneħħija ta' kampjuni tal-ħamrija minn reċipjenti ttrattati u kontroll ta' solventi għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar; żieda ta' razzjon ta' ikel; użin u distribuzzjoni każwali tad-dud fir-reċipjenti tal-ħniex; żamma ta' kampjuni sekondarji suffiċjenti ta' dud għal determinazzjoni ta' valuri analitiċi bażiċi, piż fl-imxarrab u fin-niexef, u kontenut ta' lipidi; użin tar-reċipjenti kollha tat-test għall-kontroll tal-irtuba tal-ħamrija; kontroll tal-provvista tal-arja, jekk tkun magħluqa tintuża s-sistema tat-test;
1	Kontroll tal-provvista tal-arja, reġistrazzjoni ta' x'jagħmlu d-dud u t-temperatura; teħid ta' kampjuni tal-ħamrija u tad-dud għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni ta' oġġett tat-test;
2	L-istess bħal jum 1;
3	Kontroll tal-provvista tal-arja, x'jagħmlu d-dud u t-temperatura;
4	L-istess bħal jum 1;
5 - 6	L-istess bħal jum 3;
7	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
8 - 9	L-istess bħal jum 3;
10	L-istess bħal jum 1;
11 - 13	L-istess bħal jum 3;
14	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
15 - 16	L-istess bħal jum 3;
17	L-istess bħal jum 1;
18 - 20	L-istess bħal jum 3;

▼**M4**

Jum	Attività
21	L-istess bħal jum 1; kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test; tmiem ta' fażi ta' espożizzjoni; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal ġo reċipjenti li jkun fihom ħamrija nadifa għal fażi ta' eliminazzjoni (ebda tindif ta' msaren); teħid ta' kampjuni ta' ħamrija u ta' dud minn kontrolli ta' solventi.
	Attivitajiet ta' espożizzjoni minn qabel (fażi ta' ekwilibrazzjoni) għandhom ikunu skedati, meqjusin il-proprjetajiet tal-kimika għall-ittestjar.
	Attivitajiet deskritti għal jum 3 għandhom isiru kuljum (mill-anqas fil-jiem tax-xogħol).

(b) Fażi ta' eliminazzjoni

Jum	Attività
– 6	Tħejjija u rtib tal-kostitwenti tal-ħamrija; kondizzjonament tal-ħamrja mħejjija għal 48 siegħa;
– 4	Taħlit tal-kostitwenti tal-ħamrija; distribuzzjoni tal-ħamrija mar-reċipjenti tat-test; inkubazzjoni f'kondizzjonijiet tat-test għal 4 ijiem;
0 (tmiem ta' fażi ta' assorbiment)	Kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; użin u distribuzzjoni każwali tad-dud fir-reċipjenti tal-ħniex; żieda ta' razzjon ta' ikel; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal ġo reċipjenti li jkun fihom ħamrija nadifa; teħid ta' kampjuni tal-ħamrija u tad-dud wara 4 – 6 sigħat għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
1	Kontroll tal-provvista tal-arja, reġistrazzjoni ta' x'jagħmlu d-dud u t-temperatura; teħid ta' kampjuni tal-ħamrija u tad-dud għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
2	L-istess bħal jum 1;
3	Kontroll tal-provvista tal-arja, x'jagħmlu d-dud u t-temperatura;
4	L-istess bħal jum 1;
5 - 6	L-istess bħal jum 3;
7	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
8 - 9	L-istess bħal jum 3;
10	L-istess bħal jum 1;
11 - 13	L-istess bħal jum 3;
14	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
15 - 16	L-istess bħal jum 3;
17	L-istess bħal jum 1;

▼M4

Jum	Attività
18 - 20	L-istess bħal jum 3;
21	L-istess bħal jum 1; kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test; teħid ta' kampjuni ta' ħamrija u ta' dud minn kontrolli ta' solventi.
	Tħejjija tal-ħamrija qabel ma tinbeda fażi ta' eliminazzjoni għandha ssir bl-istess mod bħal qabel il-fażi ta' espożizzjoni.
	Attivitajiet deskritti għal jum 3 għandhom isiru kuljum (mill-anqas fil-jiem tax-xogħol).

Test ta' enchytraeid

(a) Fażi ta' assorbiment bi 8 dati ta' teħid ta' kampjuni użati għal kalkulazzjoni ta' kinetika

Jum	Attività
– 6	Kondizzjonament tal-ħamrja mħejjija għal 48 siegħa;
– 4	Il-frazzjoni tal-ħamrija li tkun iffortifikata mas-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar; evaporizzazzjoni ta' kull solvent; taħlit tal-kostitwenti tal-ħamrija; distribuzzjoni tal-ħamrija mar-reċipjenti tat-test; ekwilibrazzjoni f'kondizzjonijiet tat-test għal 4 ijiem (3 ġimgħat għal ħamrija fortifikata bil-metall);
– 3 sa – 1	Separazzjoni tal-organiżmi tat-test mill-kultura għal akklima-tazzjoni; tħejjija u rtib tal-kostitwenti tal-ħamrija;
0	Kejl tat-temperatura, u l-pH tal-ħamrija; tneħħija ta' kampjuni tal-ħamrija minn reċipjenti ttrattati u kontroll ta' solventi għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar; żieda ta' razzjon ta' ikel għall-ħamrija; użin u distribuzzjoni każwali tad-dud fir-reċipjenti tal-ħniex; żamma ta' kampjuni sekondarji suffiċjenti ta' dud għal determinazzjoni ta' valuri analitiċi bażiċi, piż fl-imxarrab u fin-niexef, u kontenut ta' lipidi; użin tar-reċipjenti kollha tat-test għall-kontroll tal-irtuba tal-ħamrija; kontroll tal-provvista tal-arja, jekk tkun magħluqa tintuża s-sistema tat-test;
1	Kontroll tal-provvista tal-arja, reġistrazzjoni ta' x'jagħmlu d-dud u t-temperatura; teħid ta' kampjuni tal-ħamrija u tad-dud għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni ta' oġġett tat-test;
2	L-istess bħal jum 1;
3	Kontroll tal-provvista tal-arja, x'jagħmlu d-dud u t-temperatura;
4	L-istess bħal jum 1;
5 - 6	L-istess bħal jum 3;
7	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel għall-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
9	L-istess bħal jum 1;
10	L-istess bħal jum 3;

▼**M4**

Jum	Attività
11	L-istess bħal jum 1;
12 - 13	L-istess bħal jum 3;
14	L-istess bħal jum 1; żieda ta' razzjon ta' ikel għall-ħamrija; kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test; tmiem ta' fażi ta' espożizzjoni; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal ġo reċipjenti li jkun fihom ħamrija nadifa għal fażi ta' eliminazzjoni (ebda tindif ta' msaren); teħid ta' kampjuni ta' ħamrija u ta' dud minn kontrolli ta' solventi.
	Attivitajiet ta' espożizzjoni minn qabel (fażi ta' ekwilibrazzjoni) għandhom ikunu skedati, meqjusin il-proprjetajiet tal-kimika għall-ittestjar.
	Attivitajiet deskritti għal jum 3 għandhom isiru kuljum (mill-anqas fil-jiem tax-xogħol).

▼M4

Appendiċi 4

Ħamrija artifiċjali – rakkomandazzjonijiet dwar tħejjija u użu

Minħabba li ħamrija naturali minn sors partikolari tista' ma tkunx disponibbli s-sena kollha, u organiżmi indiġeni, kif ukoll il-preżenza ta' mikrosustanzi li jniġġsu jistgħu jinfluwenzaw it-test, huwa rrakkomandat substrat artifiċjali, il-ħamrija artifiċjali skont il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità għal Ħniex (48) biex jintuża f'dan it-test. Diversi speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu ħajjin, jikbru u jirriproduċu f'din il-ħamrija, u hija pprovduta standardizzazzjoni massima, kif ukoll komparabbiltà f'laboratorji u bejniethom ta' kondizzjonijiet tat-test u ta' kultura.

Ħamrija kostitwenti:

Pit:	10 %	Pit Sphagnum, skont skont il-Linja Gwida 207 tal-OECD (48);
Ramel tal-quartz:	70 %	Ramel tal-quartz industrijali (mnixxef bl-arja); daqs ta' ramla: aktar minn 50 % tal-partiċelli għandhom ikunu fil-firxa ta' 50-200 μm, iżda l-partiċelli kollha għandhom ikunu ≤ 2 mm;
Tafal tal-kawlina:	20 %	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %;
Karbonat tal-kalċju:	≤ 1 %	$CaCO_3$,pulverizzat, kemikament pur

B'mod fakultattiv, il-kontenut ta' karbonju organiku tal-ħamrija artifiċjali jista' jitnaqqas, eż. billi jitnaqqas il-kontenut tal-pit għal 4-5 % ta' ħamrija xotta u jiżdied il-kontenut ta' ramel b'dan il-mod. Bi tnaqqis bħal dan f'kontenut ta' karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' sorbiment ta' kimika għall-ittestjar mill-ħamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tal-kimika għall-ittestjar għad-dud tista' tiżdied (74). Intwera li *Enchytraeus albidus u Eisenia fetida* jistgħu jkunu jaqblu mal-kriterji ta' validità dwar riproduzzjoni meta ttestjati f'ħamrija ta' għelieqi b'kontenut baxx ta' karbonju organiku, eż. 2,7 % (33), (201), u mill-esperjenza dan jista' jinkiseb f'ħamrija artifiċjali b'5 % pit.

Tħejjija

Il-kostitwenti nixfin tal-ħamrija jitħalltu sewwa (eż. f'mikser ta' skala kbira f'laboratorju). Dan għandu jsir xi ġimgħa qabel ma jinbeda t-test. Il-kostitwenti nixfin imħalltin tal-ħamrija għandhom jitrattbu b'ilma dejonizzat mill-anqas 48 siegħa qabel l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test biex l-aċidità tiġi ekwilibrata/stabbilizzata. Għad-determinazzjoni ta' pH tintuża taħlita ta' ħamrija u 1 M KCl fi proporzjon ta' 1:5. Jekk il-valur pH ma jkunx fil-firxa meħtieġa (6,0 ± 0,5), jiżdied ammont suffiċjenti ta' $CaCO_3$ fil-ħamrija, jew jitħejja lott ġdid ta' ħamrija.

Il-kapaċità massima għal żamma ta' ilma (WHC) tal-ħamrija artifiċjali tiġi ddeterminata skont ISO 11268-2 (35). Mill-anqas jumejn qabel ma jinbeda t-test, il-ħamrija artifiċjali xotta titrattab billi jiżdied ilma biżżejjed dejonizzat jew rikostitwit biex jinkiseb bejn wieħed u ieħor nofs il-kontenut finali ta' ilma. Il-kontenut finali ta' ilma għandu jkun minn 40 % sa 60 % tad-WHC massima. Fil-bidu tat-test, il-ħamrija mrattba minn qabel tinqasam f'tant lottijiet daqs kemm ikun l-għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test u kontrolli użati għat-test, u l-kontenut ta' rtuba jkun aġġustat għal 40 – 60 % tad-WHC_{max} billi tintuża s-soluzzjoni tal-oġġett tat-test u/jew billi jiżdied ilma dejonizzat jew rikostitwit. Il-kontenut ta' rtuba jkun iddeterminat fil-bidu u fit-tmiem tat-test (f'105 °C). Huwa għandu jkun l-aħjar għall-ħtiġijiet tal-ispeċi (il-kontenut ta' rtuba jista' jkun iċċekkjat kif ġej: meta l-ħamrija tingħafas bil-mod fl-idejn, għandhom joħorġu qtar żgħir bejn is-swaba).

▼**M4**

Ħżin

Il-kostitwenti nixfin tal-ħamrija artifiċjali jistgħu jinħażnu f'temperatura ambjentali sakemm jibdew jintużaw. Il-ħamrija mħejjija u mrattba minn qabel tista' tinħażen f'post frisk sa tliet ijiem qabel ma tkun iffortifikata; wieħed għandu joqgħod attent li jara li l-evaporazzjoni tal-ilma tkun mill-anqas. Ħamrija fortifikata bl-oġġett tat-test għandha tkun użata minnufih sakemm ma jkunx hemm informazzjoni li turi li l-ħamrija partikolari tkun tista' tinħażen mingħajr ma jintlaqtu t-tossiċità u d-disponibbiltà bijoloġika tal-oġġett tat-test. Kampjuni ta' ħamrija fortifikata jistgħu mbagħad jinħażnu skont il-kondizzjonijiet irrakkomandati għall-oġġett tat-test partikolari sakemm issir analiżi.

▼M4

Appendiċi 5

Speċi ta' oligochaetes terrestri rrakkomandat għall-ittestjar ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn ħamrija

Hniex

L-ispeċi tat-test irrakkomandata hija *Eisenia fetida* (Savigny 1826), li hija tal-familja Lumbricidae. Mill-1972 'il hawn tinqasam f'żewġ subspeċi (*Eisenia fetida u Eisenia andrei* (10)). Skont Jaenike (36), huma mhumiex speċi veri, separati. *Eisenia fetida* tingħaraf malajr mill-faxex ta' lewn isfar jgħajjat inter-segmentali tagħha, filwaqt li *Eisenia andrei* hija ta' lewn aħmar uniformi, skur. Aktarx joriġinaw mir-reġjun tal-Baħar l-Iswed, illum huma mifruxin mad-dinja kollha, l-aktar f'habitats immodifikati antropoġenikament bħal munzelli ta' kompost. It-tnejn jistgħu jintużaw għal testijiet ekotossikoloġiċi, kif ukoll ta' akkumulazzjoni bijoloġika.

Eisenia fetida u Eisenia andrei jistgħu jinkisbu kummerċjalment, pereżempju bħala lixka għall-ħut. Mqabbla ma' dud oħra tal-ħamrija ta' lumbriċidi, iċ-ċiklu ta' ħajjithom huwa qasir u jimmaturaw f'madwar 2 – 3 xhur (f'temperatura ambjentali). L-aħjar temperatura għalihom hija bejn wieħed u ieħor 20 – 24 C. Jippreferu substrati relattivament niedja b'pH kważi newtrali u b'kontenut kbir ta' materjal organiku. Minħabba li dawn l-ispeċijiet intużaw ħafna f'testijiet ekotossikoloġiċi standardizzati għal madwar 25 sena, il-mod ta' kultura tagħhom huwa stabbilit sewwa (48) (77).

Iż-żewġ speċi jistgħu jitrabbew f'firxa wiesgħa ta' skart ta' annimali. Il-midjum ta' trobbija rrakkomandat minn ISO (35) huwa ta' taħlita 50:50 ta' demel taż-żiemel jew tal-baqar u pit. Il-midjum għandu jkollu valur ta' pH ta' madwar 6 sa 7 (irregolat bil-karbonat tal-kalċju), konduttività jonika baxxa (anqas minn 6 mS/cm jew anqas minn 0,5 % ta' konċentrazzjoni ta' melħ) u m'għandux ikun ikkontaminat b'mod eċċessiv b'ammonja jew b'awrina tal-annimali. Tista' tintuża wkoll ħamrija kummerċjali għal xogħol tal-ġnien ħielsa minn addittivi, jew ħamrija artifiċjali skont l-OECD (48), jew taħlita 50:50 tat-tnejn. Is-substrat għandu jkun niedi iżda mhux imxarrab ħafna. Kaxex għat-trobbija ta' volum ta' minn 10 litri sa 50 litru jkunu tajbin.

Biex jinkiseb dud ta' età u massa standard, l-aħjar hu li l-kultura tinbeda b'fosdqiet. Għalhekk, dud adult jiżdied f'kaxxa għat-trobbija li jkun fiha substrat frisk biex jipproduċi fosdqiet. L-esperjenza prattika wriet li kwantità densa ta' bejn wieħed u ieħor 100 dudu adult għal kull kg substrat (piż fl-imxarrab) twassal għal rati ta' riproduzzjoni tajbin. Wara 28 jum id-dud adult jitneħħa. Il-ħniex li jfaqqsu mill-fosdqiet jintużaw għall-ittestjar meta jkunu maturi wara mill-anqas xahrejn (2) iżda anqas minn 12-il xahar.

Dud tal-ispeċi deskritta hawn fuq jista' jitqies li jkun f'saħħtu jekk jiċċaqlaq fis-substrat, ma jippruvax jitlaq mis-substrat u jirriproduċi kontinwament. Ċaqliq bil-mod ħafna jew tarf tal-warrani isfar (fil-każ ta' *Eisenia fetida*) jindikaw substrat eżawrit. F'dan il-każ, huwa rrakkomandat substrat ġdid u/jew għadd iżgħar ta' annimali għal kull kaxxa.

Referenzi magħżula addizzjonali

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Land-wirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchytraeids

L-ispeċi tat-test irrakkomandata hija *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (ħanex abjad). *Enchytraeus albidus* huwa wieħed mill-akbar (sa 15-il mm) tal-ispeċi Enchytraeidae tal-familja annelid oligochaete, u jinsab mifrux mad-dinja kollha, eż. (8). *Enchytraeus albidus* jinsab f'habitats marini, limniċi u terrestri, l-aktar f'materja organika fi stat ta' degradazzjoni (alka, kompost) u rarament f'mergħat (42). Din it-tolleranza ekoloġika wiesgħa u xi varjazzjonijiet morfoloġiċi jindikaw li jista' jkun hemm razez differenti ta' din l-ispeċi.

Enchytraeus albidus jista' jinkiseb kummerċjalment, u jinbiegħ bħala ikel għall-ħut. Wieħed għandu jara jekk il-kultura tiegħu tkunx ikkontaminata minn speċijiet oħra, is-soltu iżgħar (60). Jekk ikun hemm kontaminazzjoni, id-dud kollu għandu jinħasel fl-ilma f'dixx Petri. Eżemplari kbar adulti ta' *Enchytraeus albidus* imbagħad jintgħażlu (bl-użu ta' stereomikroskopju) biex tinbeda kultura ġdida. Id-dud l-ieħor kollu jitwarrab. Iċ-ċiklu ta' ħajtu huwa qasir minħabba li l-maturità tintlaħaq bejn 33 jum (fi 18 °C) u 74 jum (fi 12 °C). Kulturi biss li jkunu nżammu fil-laboratorju għal mill-anqas 5 ġimgħat (ġenerazzjoni waħda) mingħajr problemi għandhom jintużaw għat-test.

Speċijiet oħra tal-ġeneru *Enchytraeus* huma adatti wkoll, l-aktar *Enchytraeus luxuriosus*. Din l-ispeċi tassew tgħix fil-ħamrija, u kienet deskritta mill-ġdid f'(65). Jekk jintużaw speċijiet oħra ta' *Enchytraeus*, huma għandhom ikunu identifikati b'mod ċar u l-motiv għall-għażla tal-ispeċi għandu jkun irrappurtat.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) hija speċi tal-istess grupp bħal *Enchytraeus luxuriosus*. Ma nstabx li kienet teżisti b'ċertezza fil-qasam, minħabba li kienet deskritta biss minn kulturi ta' ħniex u munzelli ta' kompost (Römbke 2003). Il-ħtiġijiet oriġinali ekoloġiċi tagħha mhumiex għalhekk, magħrufin. Iżda, studji reċenti tal-laboratorju f'diversi oqsma ta' ħamrija kkonfermaw li din l-ispeċi għandha tolleranza wiesgħa għal proprjetajiet tal-ħamrija bħal pH u sawra (Jänsch et al. 2005). F'dawn l-aħħar snin din l-ispeċi sikwit kienet użata fi studi ekotossikoloġiċi minħabba s-sempliċità tat-trobbija u l-ittestjar tagħha (eż. Kuperman et al. 2003). Iżda hija żgħira: 3 – 12 mm; 7 mm bħala medja (Westheide & Müller 1996), u dan jagħmel l-immaniġġar aktar diffiċli mqabbel ma' dak ta' *Enchytraeus albidus*. Meta tintuża din l-ispeċi minflok *Enchytraeus albidus*, id-daqs tar-reċipjent tat-test jista' iżda ma jeħtiġlux ikun iżgħar. Barra minn dan, għandu jitqies li din l-ispeċi tirriproduċi b'mod mgħaġġel ħafna billi għandha żmien ta' ġenerazzjoni ta' anqas minn 20 jum f'20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) u wkoll aktar malajr f'temperaturi għola.

Enchytraeids tal-ispeċi *Enchytraeus albidus* (kif ukoll speċijiet *Enchytraeus* oħra) jistgħu jitrabbew f'kaxex kbar tal-plastik (eż. 30 × 60 × 10 cm jew 20 × 12 × 8 cm li huma adatti għal kultura ta' dud ta' daqs żgħir) mimlijin b'taħlita ta' ħamrija artifiċjali u li jistgħu jinkisbu kummerċjalment u b'ħamrija tal-ġnien mhux kontaminata, ħielsa minn addittivi. Materjal ta' kompost għandu jkun evitat minħabba li jista' jkun fih kimiċi tossiċi bħal metalli tqal. Il-fawna għandha titneħħa mill-ħamrija tat-trobbija qabel ma tintuża b'iffriżar għal tliet darbiet. Tista' tintuża wkoll ħamrija pura artifiċjali iżda r-rata ta' riproduzzjoni tista' tkun aktar bil-mod mqabbla ma' dik miksuba b'substrati mħallta. Is-substrat għandu jkollu pH ta' 6,0 ± 0,5. Il-kultura tinżamm f'inkubatur f'temperatura ta' 15 ± 2 °C mingħajr dawl. F'kull każ għandha tkun evitata temperatura ogħla minn 23 °C. L-irtuba tal-ħamrija artifiċjali/naturali għandha tkun niedja iżda mhux imxarrba. Meta l-ħamrija tingħafas bil-mod bl-idejn, għandhom joħorġu biss ftit qtar ta' ilma. F'kull każ, għandhom ikunu evitati kondizzjonijiet anormali (eż. jekk jintuża għatu, it-toqob tal-għatu għandhom ikunu għoljin biżżejjed li jippermettu bdil suffiċjenti ta' arja). Il-ħamrija tat-trobbija għandha titrewwaħ billi titħawwad b'attenzjoni darba fil-ġimgħa.

▼M4

Id-dud għandu jintema' mill-anqas darba fil-ġimgħa sakemm jixba' bi fjokki tal-ħafur li jitqiegħdu f'ħofra fil-wiċċ tal-ħamrija u jitgħattew bil-ħamrija. Jekk fil-kontenitur ikun baqa' ikel mill-aħħar data ta' tmigħ, l-ammont ta' ikel mogħti għandu jkun aġġustat b'dan il-mod. Jekk fuq l-ikel li jifdal jikber il-faqqiegħ, huwa għandu jinbidel bi kwantità ġdida ta' fjokki ta' ħafur. Biex ir-riproduzzjoni tkun stimulata, il-fjokki tal-ħafur jistgħu jkunu ssupplimentati bi trab ta' proteini, disponibbli kummerċjalment, imtejjeb b'vitamini kull ġimagħtejn. Wara tliet xhur, l-annimali jkunu ttrasferiti għal kultura jew għal substrat ta' trobbija mħejjin friski. Il-fjokki tal-ħafur, li jkollhom jinħażnu f'reċipjenti ssiġillati, għandhom jissaħħnu f'awtoklav jew jissaħħnu qabel jintużaw biex ikunu evitati infezzjonijiet minn araknidi tad-dqiq (eż. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) jew minn araknidi tal-ħtif (eż. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Wara li jkun iddiżinfettat, l-ikel jintaħan biex ikun jista' jitferrex faċilment fuq il-wiċċ tal-ħamrija. Sors ieħor possibbli ta' ikel huwa l-ħmira tal-furnar jew l-ikel tal-ħut TetraMin®.

Inġenerali, il-kondizzjonijiet tal-mod ta' kultura jkunu suffiċjenti jekk id-dud ma jippruvax jitlaq mis-substrat, ma jiċċaqlaqx malajr fil-ħamrija, ma jurix wiċċ estern ileqq mingħajr partiċelli ta' ħamrija mwaħħlin miegħu, ikun ftit jew wisq ta' lewn bajdani u jekk ikun jidher dud ta' etajiet differenti. Fil-fatt dud jista' jitqies li jkun f'saħħtu jekk jipproduċi kontinwament.

Referenzi magħżula addizzjonali

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.