II

(Atti mhux leġiżlattivi)

REGOLAMENTI

REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (UE) Nru 260/2014

tal-24 ta' Jannar 2014

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

(Test b'relevanza għaż-ŻEE)

IL-KUMMISSJONI EWROPEA,

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

Wara li kkunsidrat ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-Reġistrazzjoni, il-Valutazzjoni, l-Awtorizzazzjoni u r-Restrizzjoni ta' Sustanzi Kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Aġenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jħassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 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]), b'mod partikolari l-Artikolu 13(3) tiegħu,

Billi:

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

(2) Jeħtieġ li r-Regolament (KE) Nru 440/2008 jiġi aġġornat biex jinkludi bi prijorità metodi ta' ttestjar alternattivi ġodda u aġġornati li ġew adottati reċentement mill-OECD, sabiex jinkiseb tnaqqis fl-għadd ta' annimali li jintużaw għal skopijiet sperimentali, skont id-Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi ([3]) u d-Direttiva tal-Kunsill 86/609/KEE tal-24 ta' Novembru 1986 dwar l-approssimazzjoni tal-liġijiet, regolamenti u dispożizzjonijiet amministrattivi tal-Istati Membri dwar il-protezzjoni tal-annimali użati għal għanijiet sperimentali u għanijiet oħra xjentifiċi ([4]).

(3) L-addatament fih żewġ metodi għad-determinazzjoni tal-proprjetajiet fiżikokimiċi, inkluż aġġornament dwar il-metodu għall-ittestjar tas-solubbiltà fl-ilma u metodu għat-test tal-koeffiċjent tal-partizzjoni rilevanti għall-valutazzjoni persistenti, bijoakkumulattiva u tossika (PBT); erba' metodi ġodda u wieħed aġġornat għad-determinazzjoni tal-ekotossiċità u d-destin u l-imġiba ambjentali; disa' metodi għad-determinazzjoni tat-tossiċità u effetti oħrajn fuq is-saħħa inkluż erba' metodi għall-ittestjar tat-tossiċità għan-nifs 'il ġewwa (inalazzjoni), li jinkludu aġġornament ta' tliet metodi u metodu ġdid wieħed biex jitnaqqsu l-annimali użati u biex titjieb il-valutazzjoni tal-effetti, aġġornament tat-test tat-tossiċità ta' 28 jum għad-doża ripetuta sabiex jinludi parametri għall-valutazzjoni tal-attività endokrinali, aġġornament tal-metodu tat-test għat-tossikokinetika rilevanti għat-tfassil u l-fehim tal-istudji tossikoloġiċi u aġġornament ta' metodi tal-ittestjar kroniċi, tal-karċinoġeniċità u kroniċi u tal-karċinoġeniċità flimkien.

(4) Ir-Regolament (KE) Nru 440/2008 għandu għalhekk jiġi emendat skont dan.

(5) Il-miżuri stabbiliti f'dan ir-Regolament huma skont l-opinjoni tal-Kumitat stabbilit bl-Artikolu 133 tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006,

([1]) ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1.
([2]) ĠU L 142, 31.5.2008, p. 1.
([3]) ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33.
([4]) ĠU L 358, 18.12.1986, p. 1.

ADOTTAT DAN IR-REGOLAMENT:

Artikolu 1

L-Anness għar-Regolament (KE) Nru 440/2008 huwa emendat skont l-Anness għal dan ir-Regolament.

Artikolu 2

Dan ir-Regolament għandu jidħol fis-seħħ fit-tielet jum wara l-pubblikazzjoni tiegħu f'*Il-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea*.

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

Magħmul fi Brussell, l-24 ta' Jannar 2014.

Għall-Kummissjoni

Il-President

José Manuel BARROSO

ANNESS

L-Anness għar-Regolament (KE) Nru 440/2008 huwa emendat kif ġej:

(1) Il-Kapitolu A.6 jinbidel b'dan li ġej:

"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 tithawwad 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 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.

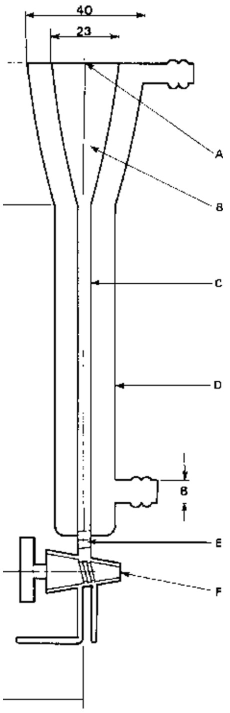
Apparat

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 ħames 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.

Figura 1



Dimensjonijiet f'mm

A. Konnessjoni għal ġonta tal-qiegħ tal-ħġieġ

B. Spazju ta' fuq

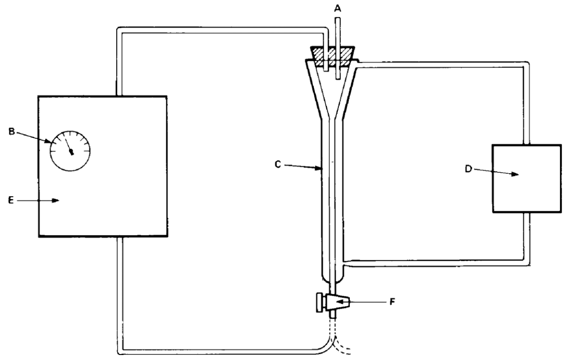
C. Ġewwa 5

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

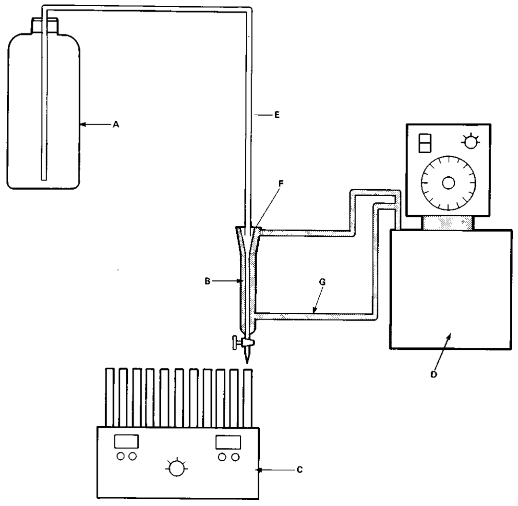
C. Mikrokolonna

D. Pompa ta' ċirkolazzjoni kkontrollata termostatikament

E. Pompa ta' ċirkolazzjoni mill-ġdid

F. Valv bidirezzjonali għal teħid ta' kampjuni

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' elużjoni 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 ħames 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.

Proċedura li tuża reċipjent ta' livellar

16. Frazzjonijiet suċċessivi ta' materjal ta' elużjoni għandhom jinġabru 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 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.

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".

(2) Jiżdied il-Kapitolu A.23:

"A.23 **KOEFFIĊJENT TAL-PARTIZZJONI (1-Ottanol/Ilma): METODU TA' TĦAWWID 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' fażi inversa (3). Il-metodu ta' 'tħawwid tal-flixkun' għandu tendenza għal oġġetti estraneji (artifacts) minħabba t-trasferiment ta' taqtiriet mikro ta' ottanol fil-fażi fl-ilma. B'valuri jiżdiedu tal-P_{OW} il-preżenza ta' dawn it-taqtiriet fil-fażi 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-fażi 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.

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.

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-fażi 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):

$$\log P_{OW} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$$

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 sigħat 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);

— 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).

[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.

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.

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-fażi 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-fażi 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-fażi 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.

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 (dekaklorobifenil) 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.

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 ittieħiedlu 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.

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 $var_{\log Pow,Av}$ kif ġej:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Is-simbolu n huwa għall-għadd ta' unitajiet sperimentali.

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-fażi 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;

— 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.

(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.

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.

— Konċentrazzjoni 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 × log P_{ow} + 4,184	0,496	3,133E+00
4,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	0,035	1,084E+00
5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 0,426	3,750E-01
5,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 0,887	1,297E-01
6	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 1,348	4,487E-02
6,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 1,809	1,552E-02
7	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 2,270	5,370E-03
7,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 2,731	1,858E-03
8	(–)0,922 × 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} = 0,88log SR + 0,41	3,763E+04
4,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,42	4,816E+04
5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,43	6,165E+04
5,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,44	7,890E+04
6	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,45	1,010E+05
6,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,46	1,293E+05
7	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,47	1,654E+05
7,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,48	2,117E+05
8	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,49	2,710E+05

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

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)
1 686	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 fażi 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' fażi fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 1 litru.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' fażi fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 2 litri.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' fażi fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 5 litri.

Jirrappreżenta < 10 % tal-volum totali ta' fażi fl-ilma, reċipjent ta' ekwilibrazzjoni ta' 10 litri.

Jeċċedi l-10 % ta' reċipjent ta' ekwilibrazzjoni anke tal-10 litri.

Prospett ta' volumi meħtieġa, bħala funzjoni ta' solubilità fl-ilma u Log P_{ow}

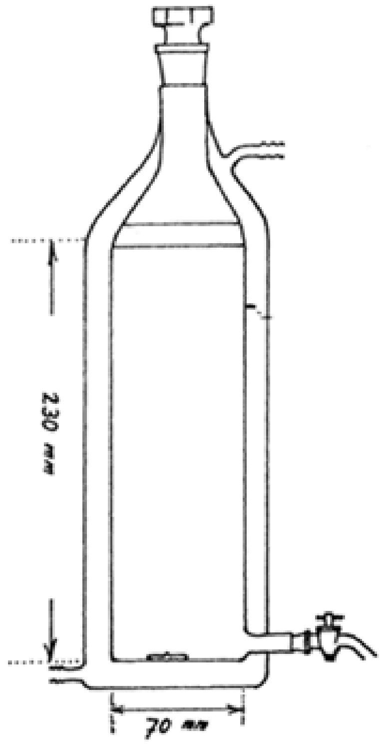
Volum minimu meħtieġ għal fażi ta' H_2O f'kull konċentrazzjoni ta' LOD (ml)

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

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
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
	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}



"

(3) Il-Kapitolu B.2 jinbidel b'dan li ġej:

"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)].

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.

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 frażi 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' espożizzjoni. 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.

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.

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 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)].

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.

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).

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 esplożivi, 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.

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 tittieħed 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' espożizzjoni 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' espożizzjoni. 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 miż-żmien 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 mukużi, 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.

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 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' 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;

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;

— 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;

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.

(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.

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. tibidil 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).

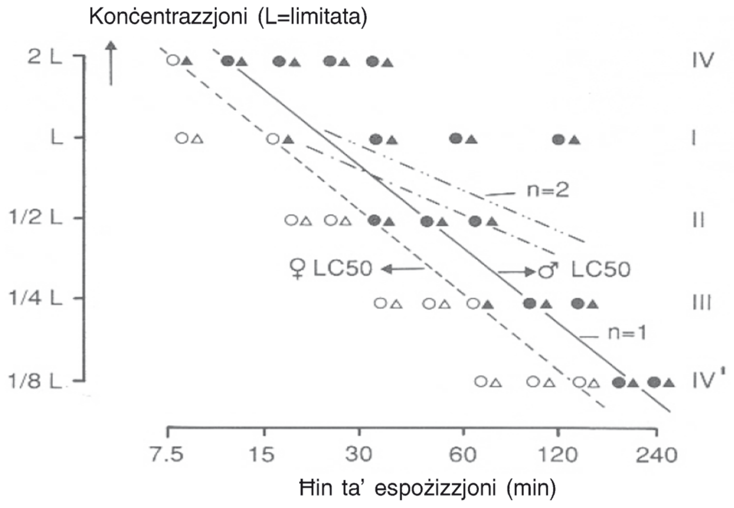
7. Il-konċentrazzjoni tal-kamra għandha titkejjel ta' spiss biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni medja peżata mal-ħin għal kull perjodu ta' espożizzjoni. Kull meta jkun possibbli, għandu jintuża l-ħin tal-mewt ta' kull annimal (iktar milli d-durata ta' espożizzjoni) fl-analiżi ta' statistika.

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:

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.

([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 ogħla. 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.

— 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**

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."

([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

([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."

(4) Il-kapitoli B.7 u B.8 jinbidlu b'dan li ġej:

"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-roditturi" (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.

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' riċetturi ta' estroġenu jew androġenu, iżda kważi fil-każijiet kollha naqas milli jidentifika sustanzi endokrinali attivi li b'mod dgħajjef jaffettwaw riċetturi 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 hawn 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'dożi 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 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' dożi

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.

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-dożi 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-dożi, 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.

Amministrazzjoni ta' dożi

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-morbidità 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 mukużi, 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.

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 aminotransferażi, aspartate aminotransferażi, fosfatażi alkalina, γ-glutamil trans-peptidase u glutamat ta' deidroġenażi), 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 ittieħdilha 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.

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 kolinesterażi. Dawn jeħtiġilhom ikunu identifikati għal kimiċi f'ċerti klassijiet jew abbażi 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.

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-meżoċefalu), 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-omeostażi 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.

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 tingabar 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 tingabar 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;

— 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

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.

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.

(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.html

(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.

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 sigħat 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.

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' 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

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 frażi 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).

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' kolinesterażi 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 enfażi 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).

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' 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 ittieħdilha 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.).

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 fażi 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 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). 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-fażi 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-fażijiet imħallta.

OSSERVAZZJONIJIET

31. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament qabel, matul u wara l-perjodu ta' espożizzzjoni. Jistgħu jkunu indikati osservazzjonijiet 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.

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 mukużi; il-bidliet fis-sistema respiratorja u ċirkulatorja, il-bidliet fis-sistema nervuża, u l-bidliet fl-attività somatomotorja 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. kolinesterażi, lipidi, ormoni, bilanċ ta' aċidu/bażi, metemoglobina jew korpi ta' Heinz, kinażi tal-kreatina, proporzjon ta' mjelojde/eritrojde, troponini, gassijiet ta' demm arterjali, deidroġenażi lattat, deidroġenażi tas-sorbitol, glutamat ta' deidroġenażi u gamma glutamil transpeptidażi).

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 (*)	Aminotransferażi tal-alanina
Kolesterol totali	Aspartate aminotransferażi
Trigliċeridi	Fosfatażi 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 abbażi ta' ipoteżi li jiffokaw fuq l-alveolitis, l-infjammazzjoni pulmonari, u l-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 deidroġenażi lattat. Parametri oħra li jistgħu jitqiesu huma dawk li jindikaw ħsara liżosomali, fosfolipidożi, fibrożi 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).

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/meżoċefalu)	**Milsa**
[Għajnejn (retina, nerv ottiku) u tebqiet l-għajnejn]	Stonku
Qalb	**Testikoli**
Kliewi	**Timu**
Larinġi (3 livelli, 1 livell biex jinkludi l-bażi tal-epiglotta)	Tirojde
Fwied	Trakea (mill-anqas 2 livelli inkluża 1 taqsima lonġitudinali 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
It-tessuti nażofarinġali (mill-anqas 4 livelli; 1 livell biex jinkludi l-kanal nażofarinġali u t-Tessut Limfojde b'Assoċjazzjoni Nażali (NALT)	Il-leżjonijiet kbar kollha
Esofagu	
[Basla tax-xamm]	
Ovarji	

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 nażofarinġali, li wieħed minnhom għandu jinkludi l-kanal nażofarinġali, (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-larinġi, 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 lonġitudinali 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 għattessuti 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.

— 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.

— 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).

— 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.

(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).

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-Ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar."

(5) Il-Kapitoli B.29 u B.30 jinbidlu b'dan li ġej:

"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-irġiel 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 istopatoloġiċi 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' ħaddiema 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. Għal-kemm 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.

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' 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

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 frażi 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).

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' kolinesterażi 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 enfażi 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.

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.

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 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' espożizzzjoni jkun aċċettabbli. 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. 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.

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 mukużi; 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.

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. kolinesterażi, lipidi, ormoni, bilanċ ta' aċidu/bażi, metemoglobina jew korpi ta' Heinz, kinażi tal-kreatina, proporzjon ta' mjelojde/eritrojde, troponini, gassijiet ta' demm arterjali, deidroġenażi lattat, sorbital deidroġenażi, glutamat ta' deidroġenażi u gamma glutamil transpeptidażi).

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 (*)	Aminotransferażi tal-alanina
Kolesterol totali	Aspartate aminotransferażi
Trigliċeridi	Fosfatażi 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).

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 deidroġenażi lattat. Parametri oħra li jistgħu jitqiesu huma dawk li jindikaw ħsara liżosomali, fosfolipidożi, fibrożi 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.

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/meżoċefalu)	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 lonġitudinali tul il-karina u taqsima 1 trasversali)
Glandola mammarja (mara)	[Ureteru]
Muskolu (koxxa)	[Uretra]
Tessuti nażofarinġali (mill-anqas 4 livelli; 1 livell biex jinkludi l-kanal nażofarinġali u t-Tessut Limfojde b'Assoċjazzjoni Nażali (NALT))	Bużżieqa tal-awrina
	Utru
	Organu mmirat
	Il-leżjonijiet u l-mases kollha kbar

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 nażofarinġali, li wieħed minnhom għandu jinkludi l-kanal nażofarinġali (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-larinġi, 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 lonġitudinali 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.

— 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.

— 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).

— 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.

(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).

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-Ittestjar: Kwalunkwe sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

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.

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).

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 dożi 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-fażi kronika jew fil-fażi 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'dożi 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.

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 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 mill-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.

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.

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' dożi 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.

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' roditur 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-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.

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.

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 (aminotransferażi tal-alanina, aspartate aminotransferażi, glutamat ta' deidroġenażi, aċidi totali tal-bili) (31), u mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatobiljari (fosfatażi alkalina, gamma glutamil trasferimentażi, 5'-nukleotidażi, bilirubina totali, aċidi totali tal-bili) (31). Parametri oħra ta' bijokimika klinika bħal trigliċeridi sajmin, ormoni speċifiċi u kolinesterażi 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.

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 esklużi 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 (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 (bil-fors 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.

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;

— 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;

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.

(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 Hindlimb 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.

(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.

Appendix 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar."

(6) Il-Kapitoli B.32 u B.33 jinbidlu b'dan li ġej:

"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.

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 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-fażi kronika jew fil-fażi 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.

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' 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'dożi 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).

Gruppi ta' dożi 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, morbidità jew 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' 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 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 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' 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.

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.

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-speċijiet 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.

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.

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 (bil-fors 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.

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;

— 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);

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.

(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.

(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.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittejstjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

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.

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 karċino-ġeniċità 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 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).

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'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. 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.

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 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.

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;

— 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.

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):

— 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.

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 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 (aminotransferażi tal-alanina, aspartate aminotransferażi, glutamat ta' deidroġenażi, aċidi totali tal-bili) (39), u mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatobiljari (fosfatażi alkalina, gamma glutamil trasferimentażi, 5'-nukleotidażi, bilirubina totali, aċidi totali tal-bili) (39). Parametri oħra ta' bijokimika klinika bħal trigliċeridi sajmin, ormoni speċifiċi u kolinesterażi 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 diffiċli. 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.

48. Piżijiet ta' organi għandhom jinġabru mill-annimali kollha, minbarra dawk esklużi 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 (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 (bil-fors 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 (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-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. 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.

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 (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 (bil-fors 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.

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.

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):

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,

— 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).

(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.

(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.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar."

---

(7) Il-Kapitolu B.36 jinbidel b'dan li ġej:

"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.

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' tinġabar 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.

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,

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-istudju 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.

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-disponibbiltà 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, 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:

Assorbiment ta' perċentwali = (arja ta' teħid tan-nifs + urine + 'il barra + karkassa mingħajr kontenuti tas-sistema GI)/ammont amministrat × 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.

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).

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-dożi 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 fażi 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' fażi 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.

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 tinġabar 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.

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 jinġemgħu 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;

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-Fażi I bħal isoenzimi tas-sistema ta' ossiġenażi mono li jkunu jiddependu minn Ċitokromju P450, enzimi tal-Fażi II bħal isoenzimi ta' sulfotransferażi jew glucuronosyl trasferimentażi 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).

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'ċerti 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).

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;

(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 tingħabar fil-qosor u tiġi ttabulata b'evalwazzjoni xierqa ta' statistika u deskritta fit-test ta' din it-taqsima. Dejta ta' radjuattività magħduda għandha tingħabar 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.

— 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.

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 kkonsultat 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-dożi. 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.

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.

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.

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)].

Bilanċ tal-massa: Kontabbiltà tal-kimika għall-ittestjar li tkun daħla 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.

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."

(8) Jiżdied il-Kapitolu B.52:

"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 irrriveduta (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 perikolużi 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 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 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 korrużivi [1] jew irritanti b'mod sever, m'għandhomx ikunu ttestjati b'dan il-Metodu ta' Ttestjar [ara GD 39 (8)].

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Huwa l-prinċipju tat-test li abbażi 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 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

[1] L-evalwazzjoni tal-korrużività 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.

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 frażi 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.

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 tħin 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.

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).

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.

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-osservazz-jonijiet 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 jidħru 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.

30. Osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn u l-membrani mukużi, 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 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 kemm jieħdu żmien effetti tossiċi u riversibbiltà, u sejbiet minn awtopsji.

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;

— 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;

— 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).

(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]

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

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

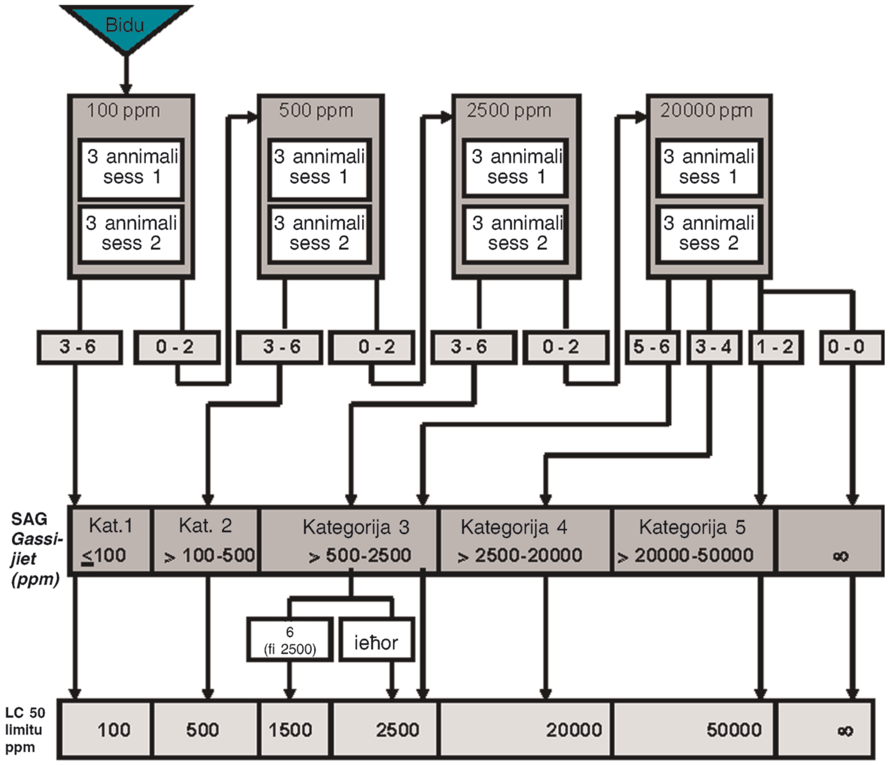
Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

([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.

Appendiċi 2a

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 100 ppm/4h għall-gassijiet

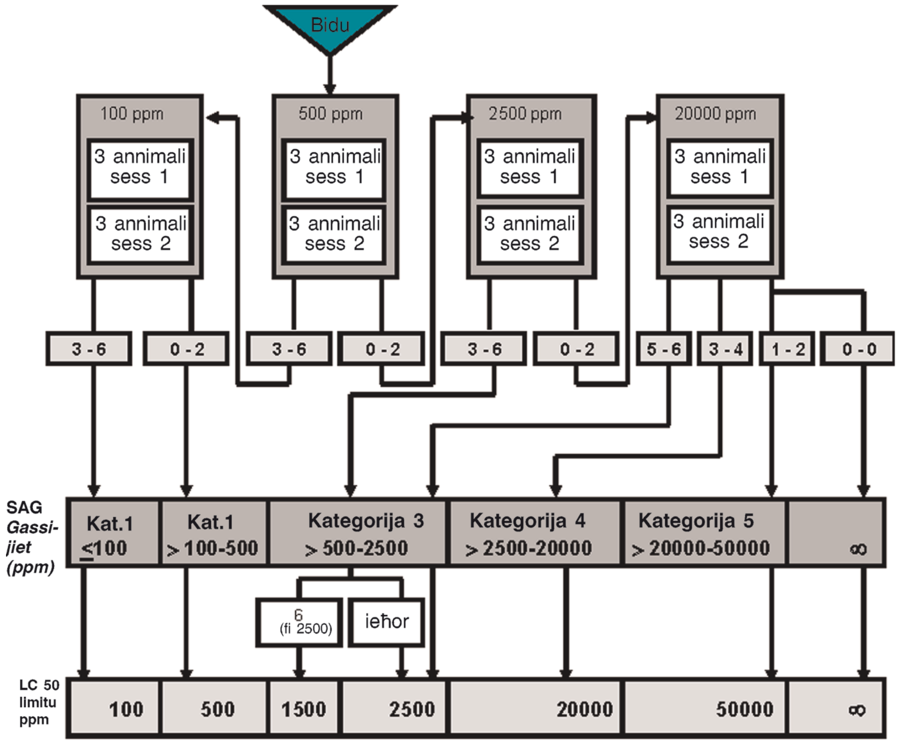


- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

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

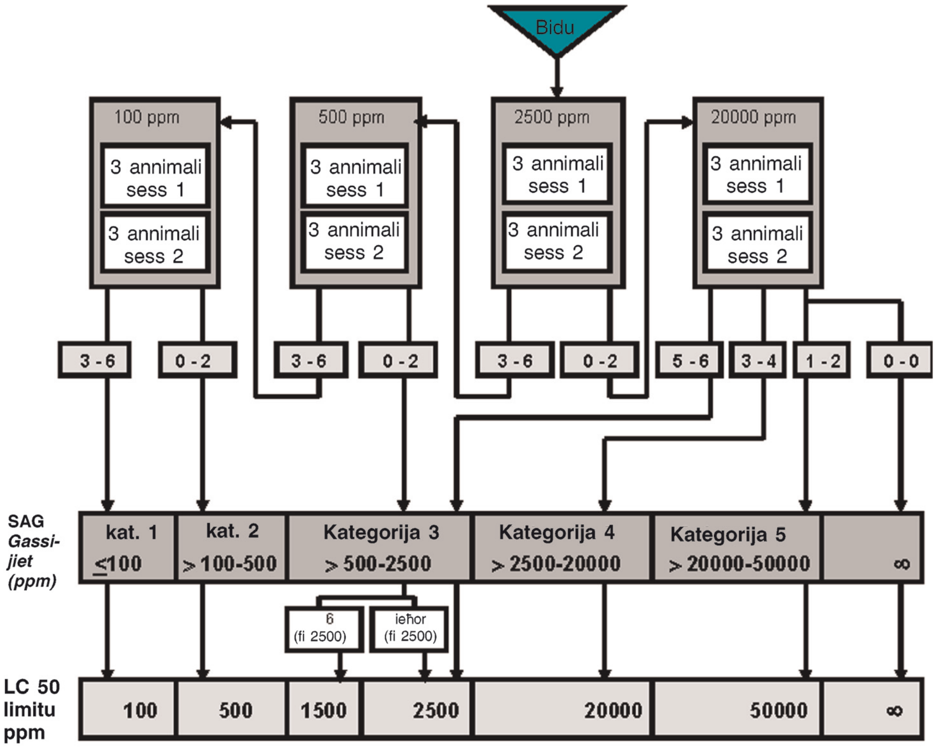
— ∞: mhux ikklassifikat

— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

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

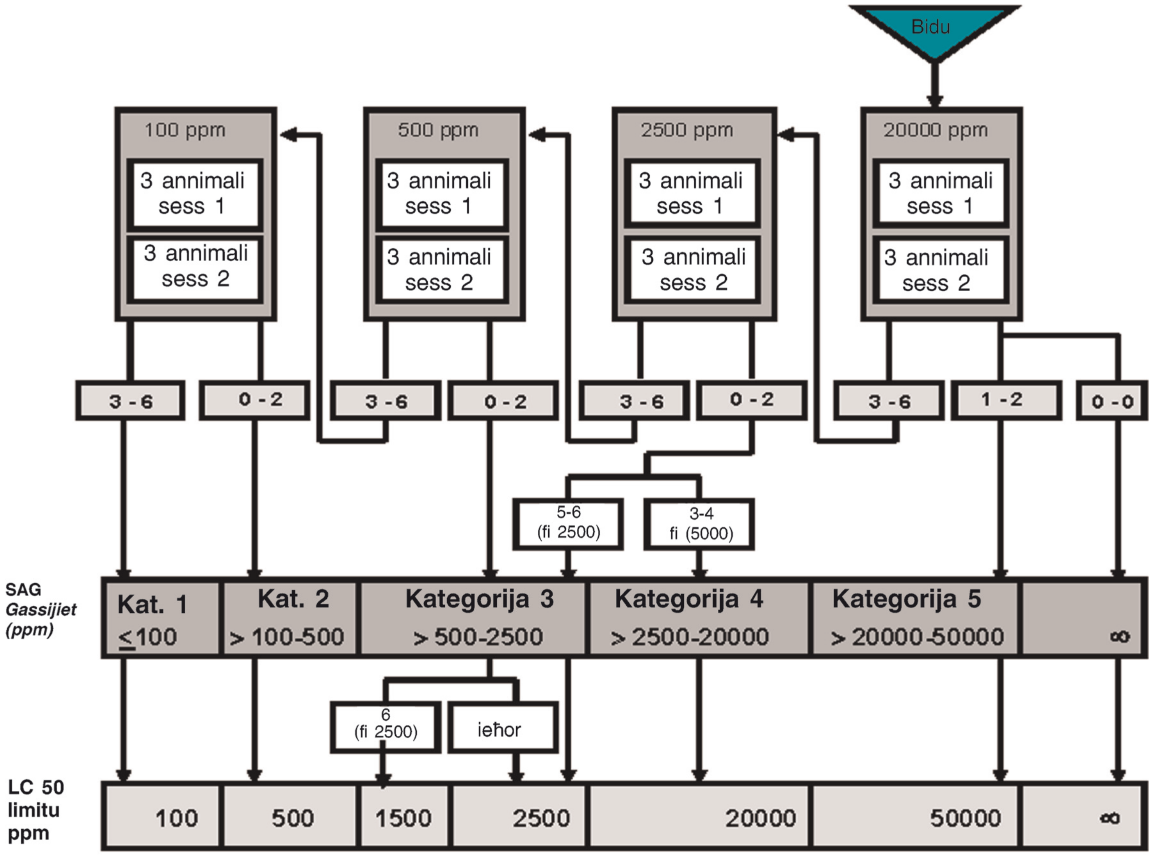
— ∞: mhux ikklassifikat

— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

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)

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

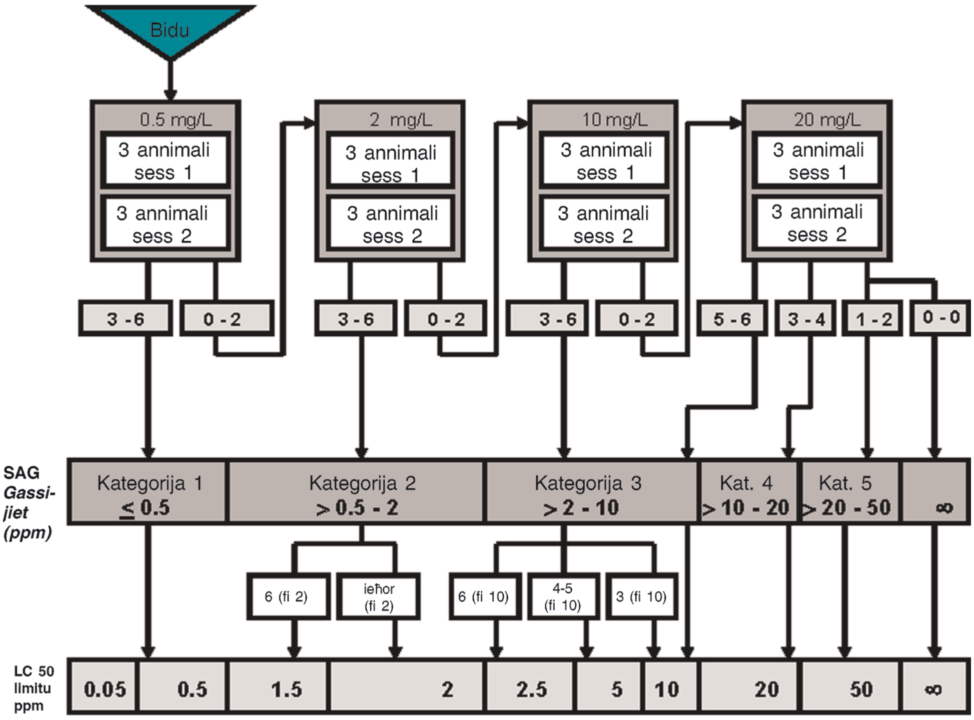
Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

([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.

Appendiċi 3a

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 0,5 mg/L/4h għall-fwar

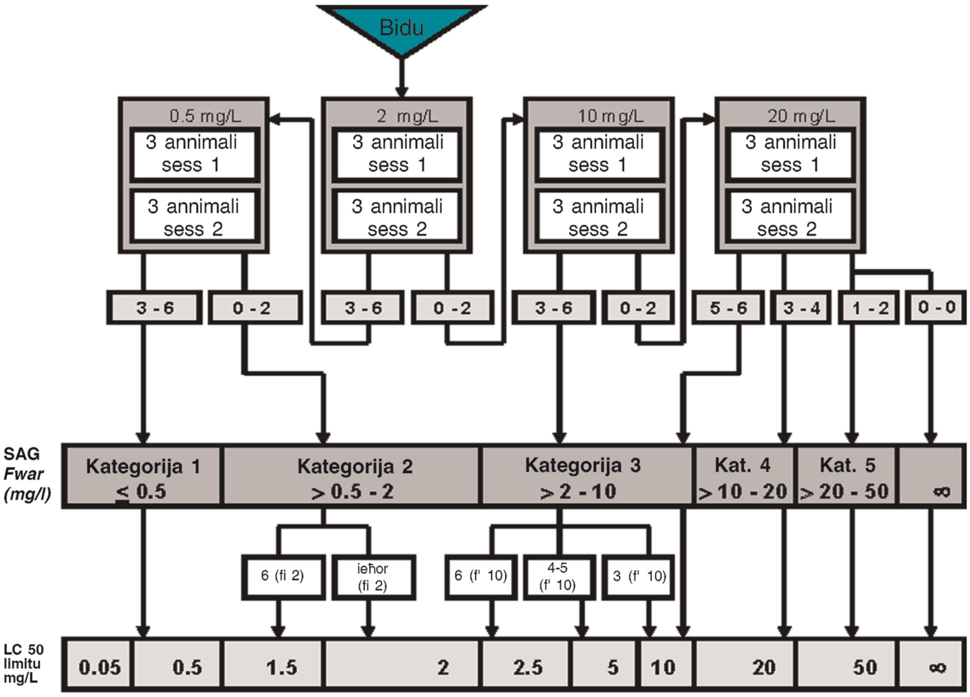


- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

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

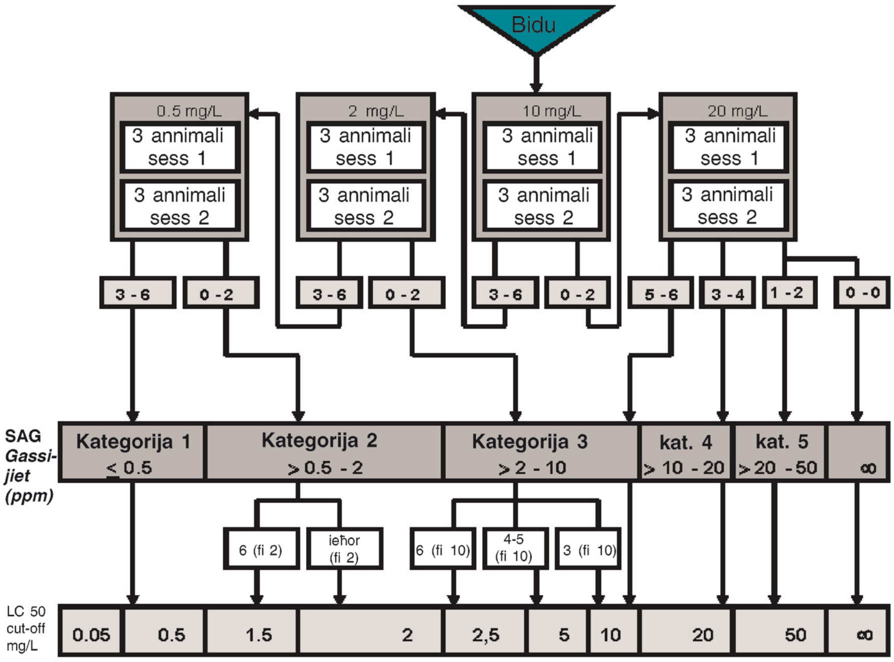
— ∞: mhux ikklassifikat

— Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

Appendiċi 3c

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 10 mg/L/4h għall-fwar

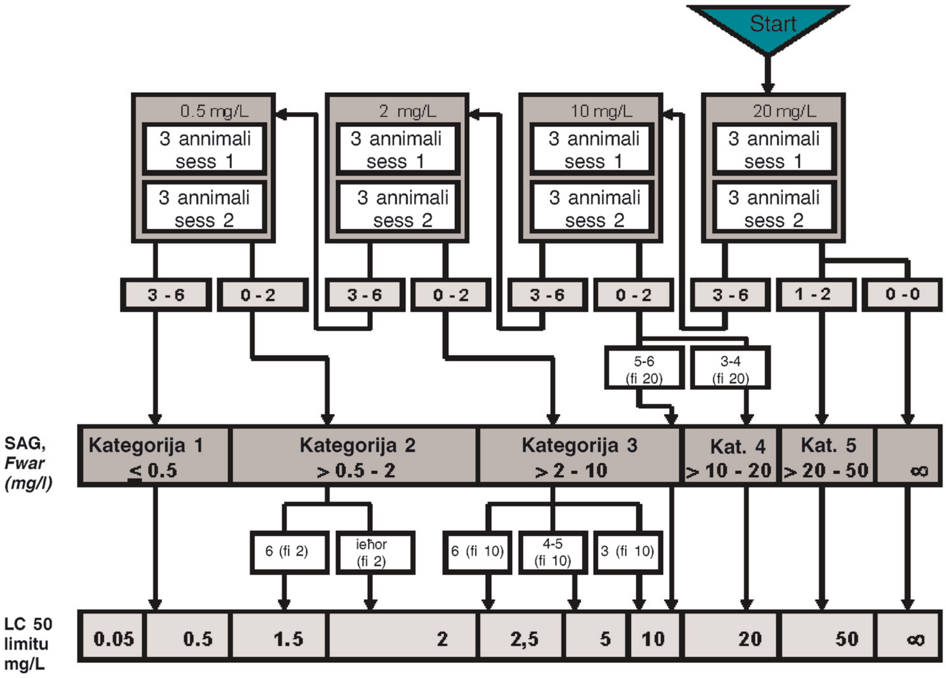


- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0–6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

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)

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

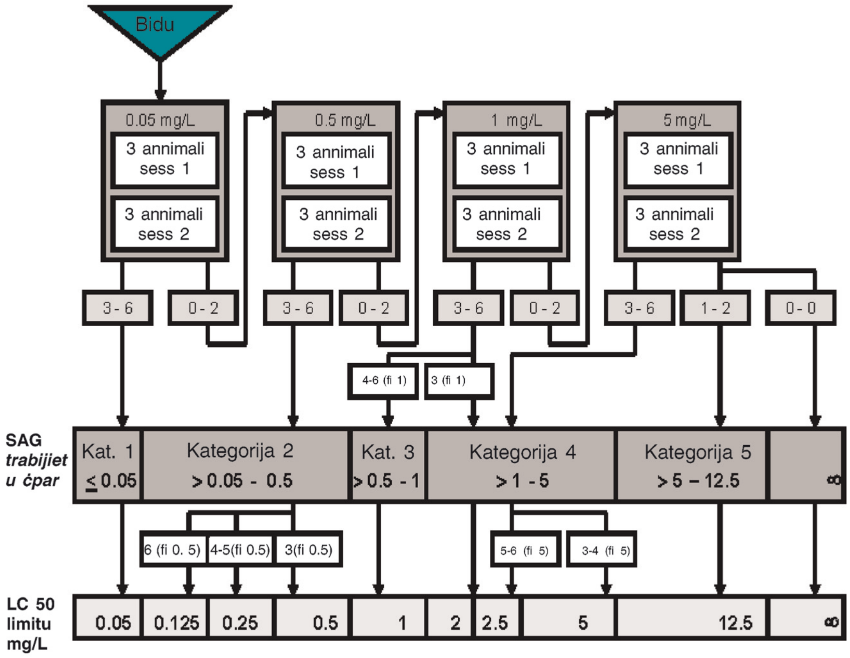
Skont kemm ikun l-għadd ta' annimali maqtulin b'mod uman jew mejta, il-proċedura tat-test issegwi l-vleġeġ indikati.

([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.

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

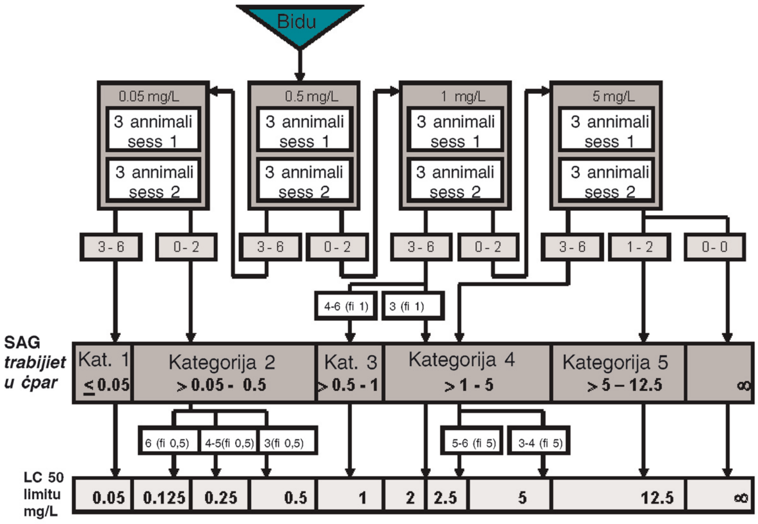
— ∞: mhux ikklassifikat

— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

Appendiċi 4b

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwalib'konċentrazzjonital-bidu ta' 0,5 mg/L/4h għall- aerosoli

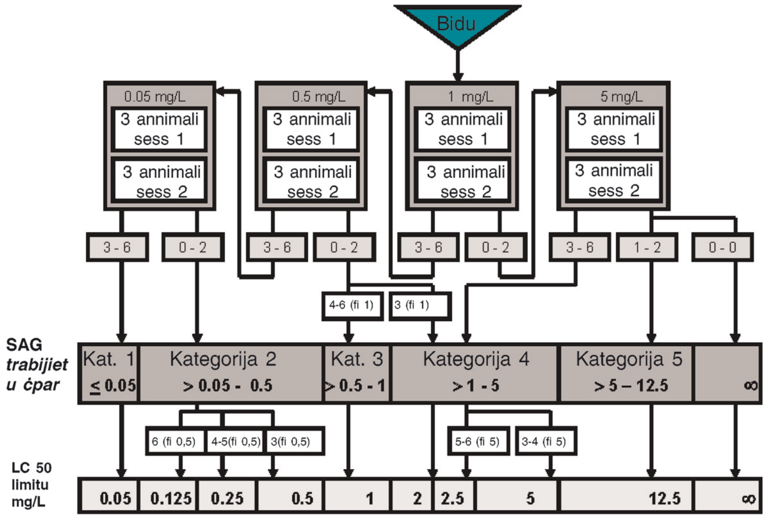


— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
— SAG: Sistema Armonizzata Globalment
— ∞: mhux ikklassifikat
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

Appendiċi 4c

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

Proċedura testwalib'konċentrazzjonital-bidu ta' 1 mg/L/4h għall- aerosoli

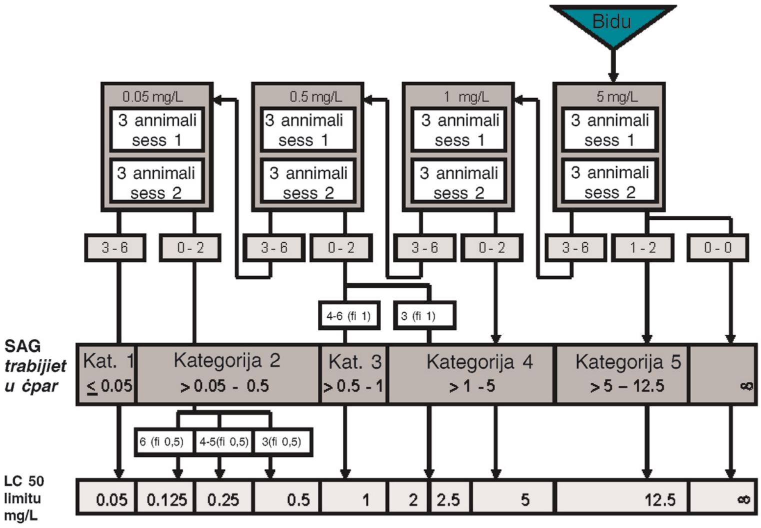


— 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
— 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
— SAG: Sistema Armonizzata Globalment
— ∞: mhux ikklassifikat
— Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

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)"

(9) Il-Kapitolu C.10 huwa sostitwit b'dan li ġej:

"C.10. **TRATTAMENT TA' SIMULAZZJONI TESTAEROBIKA TAD-DRANAĠĠ: C.10-A: UNITAJIET TA' ĦAMA ATTIVAT - C.10-B: BIJORITI**

C.10-A: Unitajiet ta' Ħama 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 wħud 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 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 wħud 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 porużi) 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.

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 preżunta 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 jittieħdux 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).

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 għalkollox 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, imħallat 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'piżijiet 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 lura. Is-sistema kollha tista' titrikkeb f'banjumarija kkontrollat termostatikament. Borom porużi 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.

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.

32. 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

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.

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' $FeCl_3$;

— il-pompa ta' estrazzjoni bl-arja tista' tiġi sostitwita b'pompa peristaltika, biex b'hekk ikun jista' jkun hemm 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' stokkijiet (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. Ċentrifugu 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-fażi 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.

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 ittieħdilha 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)

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.

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.

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.

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.

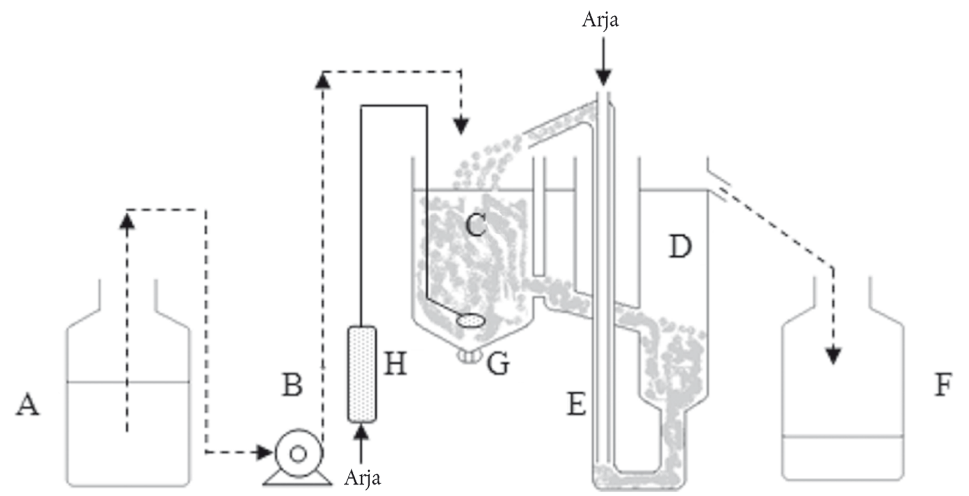
(18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

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

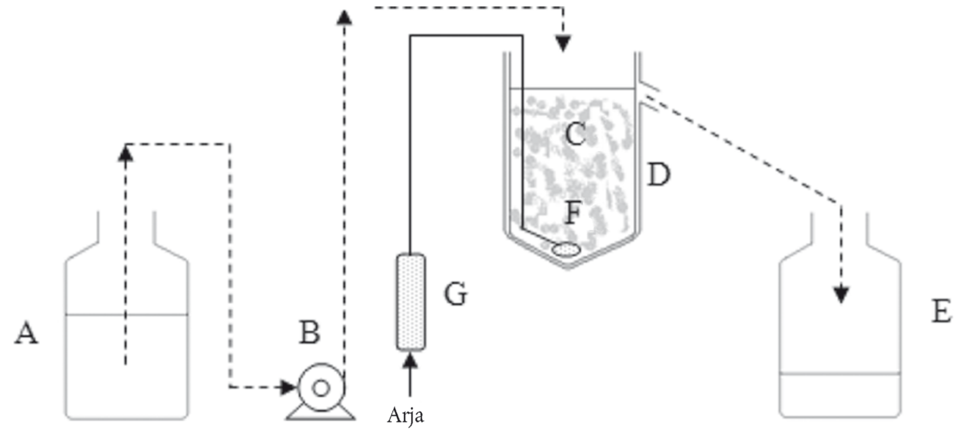
G. Rewwieħ

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

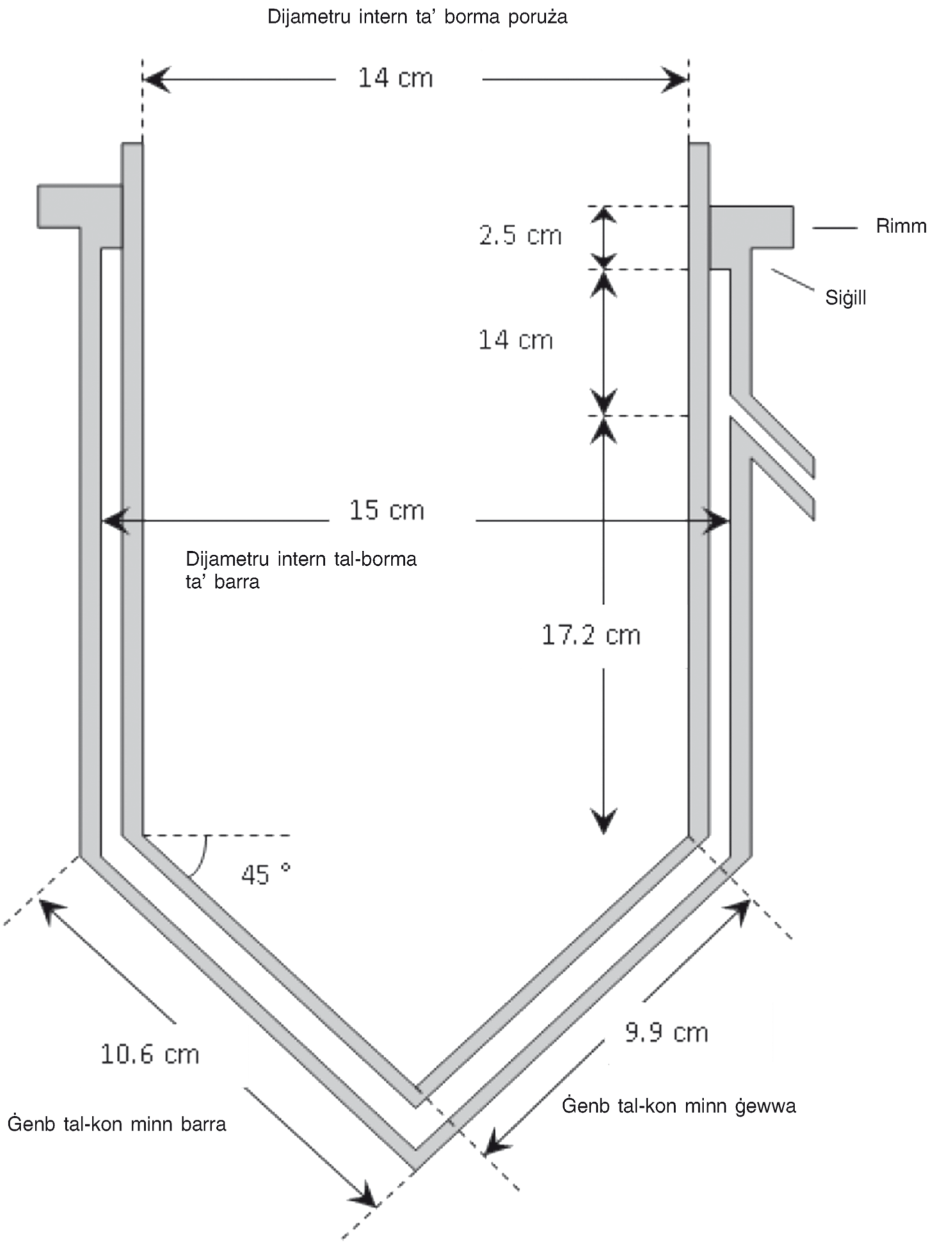
E. Reċipjent ta' ġbir

F. Diffużur

G. Miter ta' fluss ta' arja

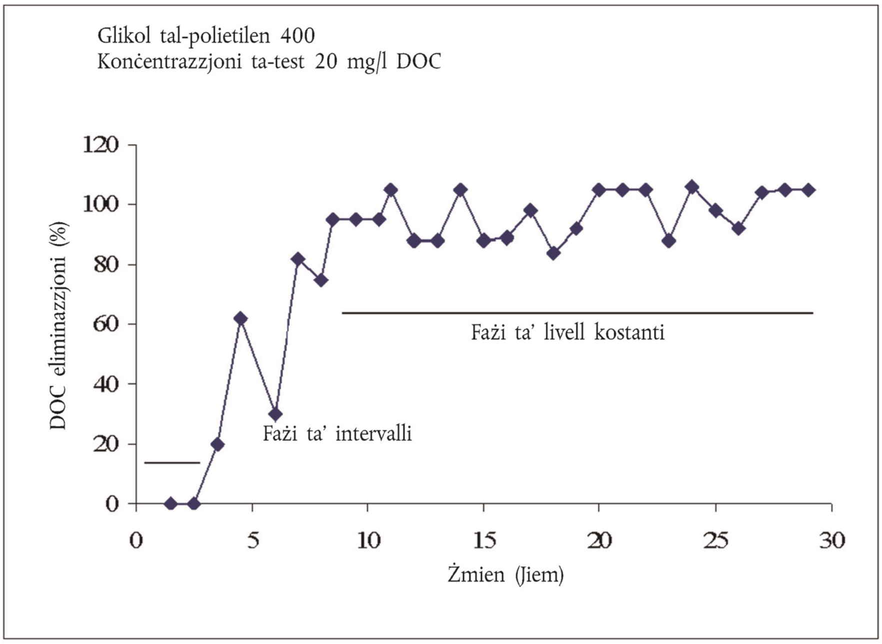
Figura 3

Dettalji ta' reċipjent ta' tirwiħ ta' borma poruża ta' 3 litri



Appendiċi 2

Eżempju ta' kurva ta' eliminazzjoni



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.

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.

   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.

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.

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'fażi 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

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'.

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 porużi 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.

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 porużi (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

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.

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 approssimazzjoni 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-mikro-organiżmi 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.

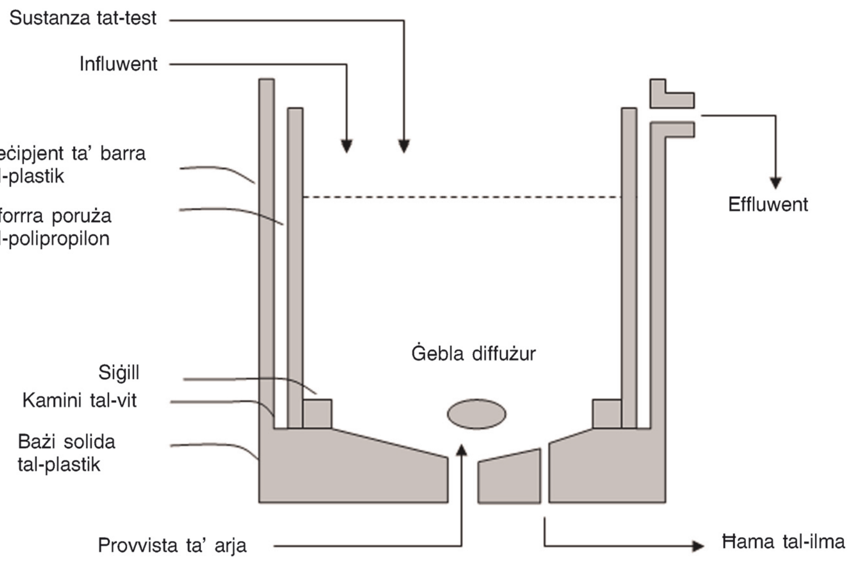
(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

(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.

Appendiċi 6.1

Borma Poruża b'Kontroll SRT



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:

$$\frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

jew

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \vartheta_s)}{\vartheta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

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' $\mu_m(d^{-1})$

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:

$$\frac{1}{\vartheta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

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

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

u

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

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. $S_1 \cdot \vartheta_S$.

Arranġament mill-ġdid tal-ekwazzjoni (1) jagħti

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Jekk K_d jkun żgħir, allura $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$ u [5] isir:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Għalhekk, il-grafika għandha tkun linja dritta (ara l-Figura 2) tal-anglu $1/\mu_m$ u l-interċezzjoni K_S/μ_m; ukoll $\vartheta_S \sim 1/\mu_m$.

Figura 1

Tliet temperaturi; ħames SRTs

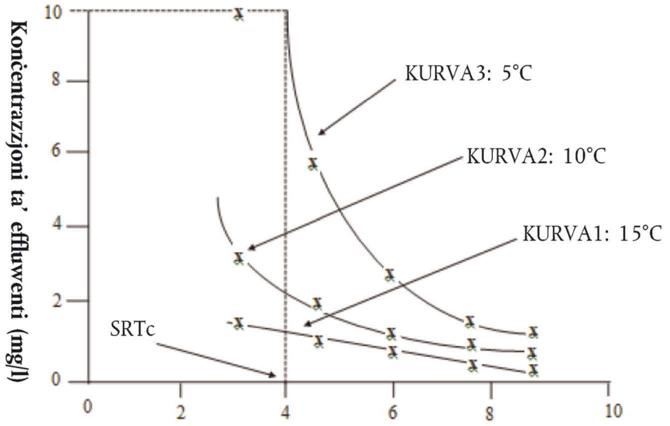
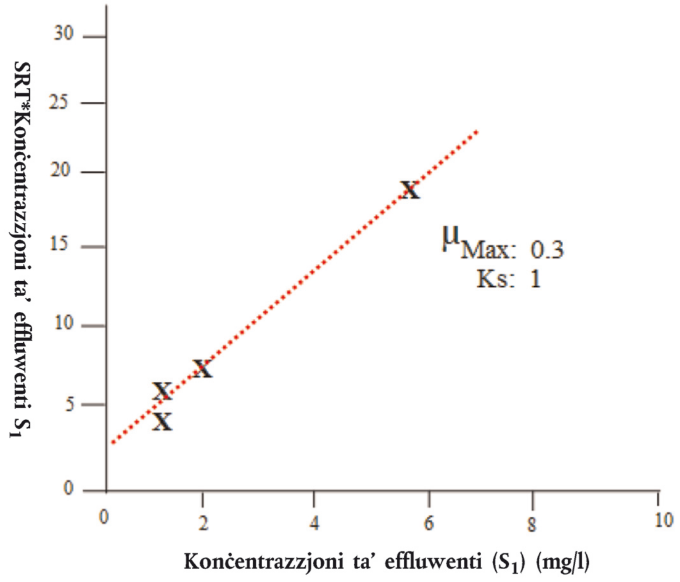


Figura 2

Linja ta' Rigressjoni SRT S_1 vs S_1 fuq T = 5 °C



Glossarju:

Konċentrazzjoni ta' effluwenti:

Kurva:

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 shabu (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 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.

(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.

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.

7. Effluwent mit-tubu jinġabar 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).

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 susssegwenti (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.

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 għall-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 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 tiegħu 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.

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 hemm 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.

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)

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 sussegwentement 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' intervalli, 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' degradazzjoni 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.

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;

— 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-konċen-trazzjoni;

— 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.

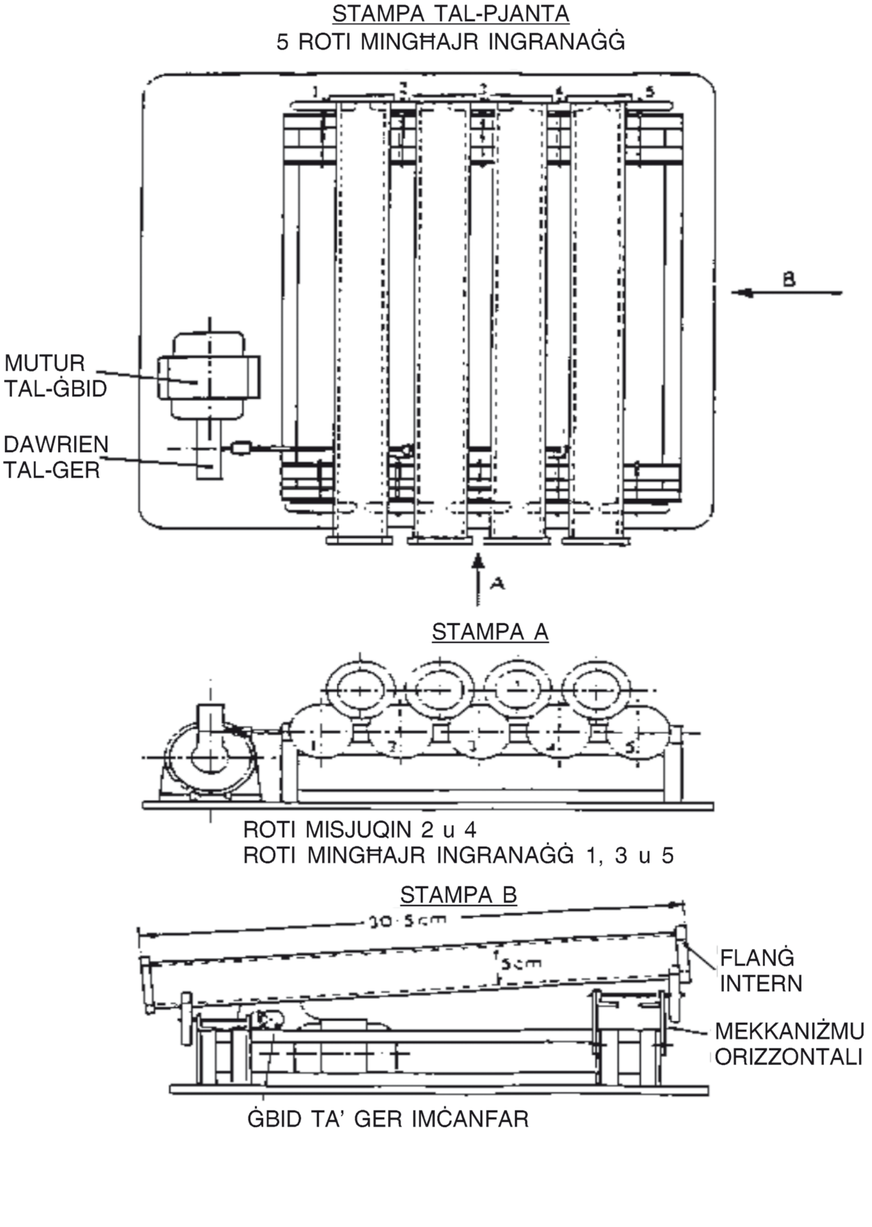
(9) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà 'Faċli' A-F.

(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.

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:

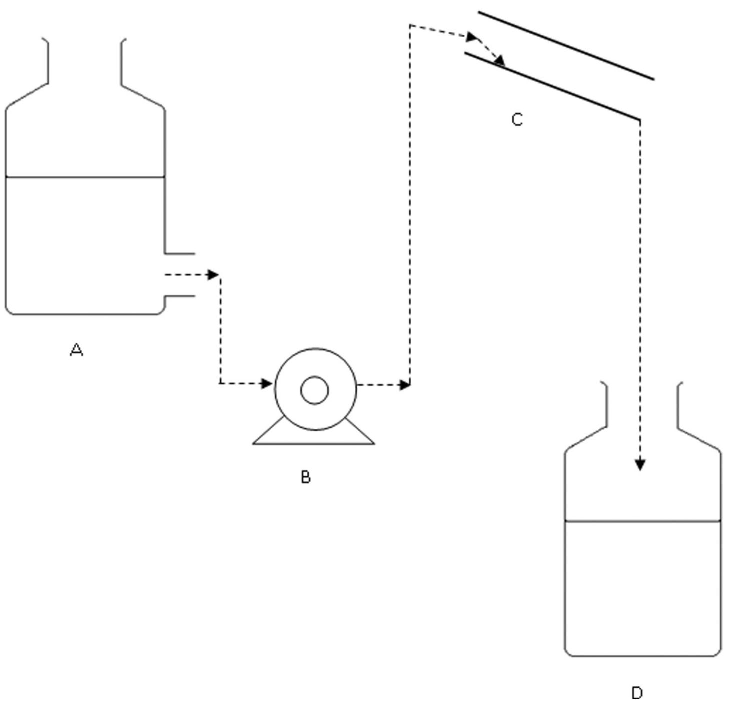
Flanġ intern:

Mekkaniżmu orizzontali:

Ġbid ta' ger imċanfar:

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-frażi "kimika" tintuża ġeneralment fil-ftehimiet tal-UNCED u f'dokumenti li ġew wara biex tinkludi sustanza, prodotti, taħlitiet, thejjijiet, jew kull frażi oħra li tista' tintuża f'sistemi eżistenti biex jindikaw "kopertura".""

(10) Il-Kapitoli C.27, C.28, C.29 u C.30 huma miżjuda:

"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.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel fażi 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 fażi 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.

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, mithun 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 ($CaCO_3$) 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.

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)).

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.

Stabilizzazzjoni

24. Malli jkun tħejja s-sediment iffortifikat bl-ilma ta' fuq, tkun ħaġa mixtieqa li titħalla ssir partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar mill-fażi 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 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 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 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).

26. 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 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.

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 mitħun 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 mitħunn 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.

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.

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'ittestjar 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).

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:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

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

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

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

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;

— 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.

(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.

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.

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 mitħun 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 wħud minn dawk li jagħmlu esperimenti ssuġġerew li kuxxinett tat-tajjar mgħaddas f'soluzzjoni saturata tas-sukrożju jista' jservi ta' ikel għal adulti evoluti.

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.

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

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.

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, mitħun 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.

Appendiċi 4

Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettbbli

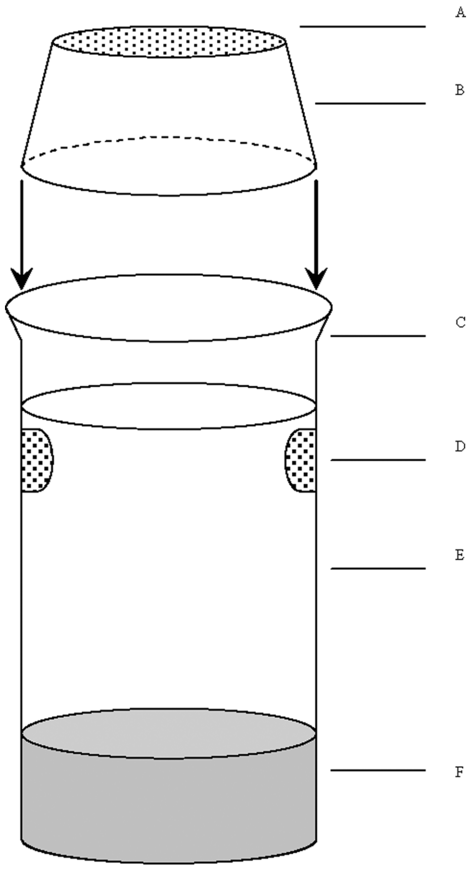
Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja partikulata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 μg/l
Ebusija bħala $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Kloru residwali	< 10 μg/l
Pestiċidi organofosforużi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloriċi totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
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).

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

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 għal 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;

— 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;

— 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 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) 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).

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.

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 abbażi 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' 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)).

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.

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 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 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.

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 mitħun 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 mitħunn 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 sigħat 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.

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 siegħa 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 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, 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' 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 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'ittestjar 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:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

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

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

$$x_i = 1 / \left(\mathrm{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

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 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, kondut-tività, 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;

— 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 (pappa-moski 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 devjazz-jonijiet 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.

(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.

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.

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 mitħun 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 wħud minn dawk li jagħmlu esperimenti ssuġġerew li kuxxinett tat-tajjar mgħaddas f'soluzzjoni saturata tas-sukrożju jista' jservi ta' ikel għal adulti evoluti.

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
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

	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)
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

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.

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, mitħun 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.

Appendiċi 4

Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettbbli

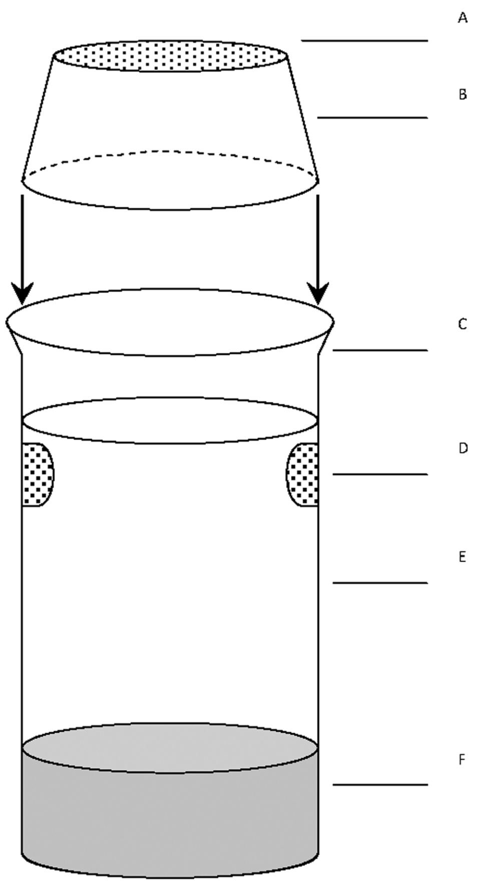
Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja partikulata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 μg/l
Ebusija bħala $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Kloru residwali	< 10 μg/l
Pestiċidi organofosforużi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloriċi totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
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).

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

"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 titharisx għal xi kimiċi li jkunu hekk 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.

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-fażi 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-fażi gassuża kif ukoll f'dik likwida tkejjel mingħajr trattament; aktar minn 90 % ta' IC ifformat kien jinsab fil-fażi 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-fażi 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).

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.

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

Kimika għall-ittestjar	Perċentwali medju ta' bijodegradazzjoni (28d)	Koeffiċjent ta' varjazzjoni (%)	Għadd ta' laboratorji
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;

(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. Uża 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).

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 tiħaffef 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).

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.

<u>Twissija:</u> 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 jinġabar 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.

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.

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.

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 ittieħidlu 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.

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-fażi likwida minn fliexken separati (mhux magħmulin aċidużi), 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-fażi 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-fażi 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.

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:

$$TIC = (\text{mg C fil-likwidu} + \text{mg C fl-ispazju fuq}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Ekwazzjoni [1]}$$

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 deskritt fil-paragrafi 60 u 61. Perċentwali ta' bijodegradazzjoni (% D) f'kull każ tidher bħala:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Ekwazzjoni [2]}$$

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 saż-żmien 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 $TIC = V_L \times C_L$.

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)$)/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, 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.

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 ogħla 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 aċidużi 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 ogħla.

(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

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-ogħla 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-ogħla 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;

— 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.

(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.

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 mikrometer 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.

Fażi 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).

Fażi ta' degradazzjoni: Iż-żmien mit-tmiem tal-perjodu ta' intervalli saż-żmien meta jkun intlaħaq 90 % tal-livell massimu ta' degradazzjoni.

Fażi ta' livell kostanti: Fażi ta' livell kostanti hija l-fażi li fiha d-degradazzjoni tilħaq l-aqwa tagħha u l-kurva tal-bijodegradazzjoni tkun sabet il-livell tagħha.

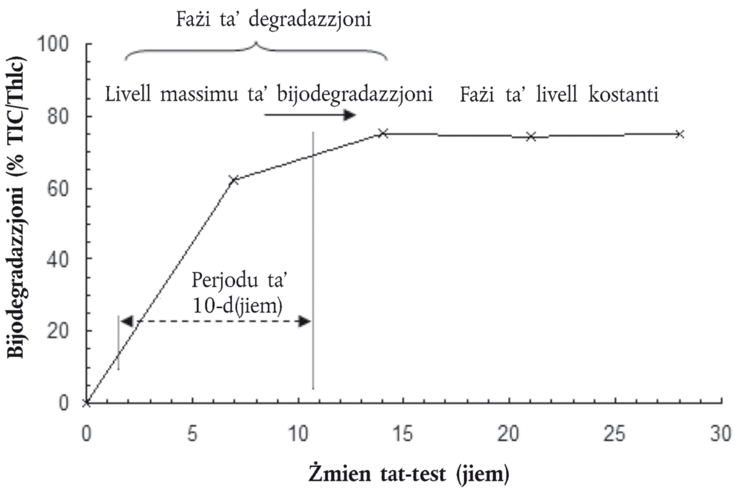
Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew taħlita ttestjata billi jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Appendiċi 2

Eżempju ta' kurva ta' bijodegradazzjoni

Figura 1

Bijodegradazzjoni ta' ottanol-1 fit-test ta' Spazju Fuq ta' CO_2 Glossarju



Biodegradation:

Bijodegradazzjoni:

Fażi ta' degradazzjoni:

Livell massimu ta' bijodegradazzjoni:

Fażi ta' livell kostanti:

Perjodu ta' 10-d(jiem):

Żmien tat-test (jiem):

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);

— 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)).

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 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-fażi 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-fażi ta' eliminazzjoni m'għandux ikun aktar minn 20 % mqabbel mal-piż ġdid inizjali (f.w.) fil-bidu ta' kull fażi.

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.

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 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 mitħun 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 mitħun 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.

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 jinġabar 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 hemm 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 suffiċjenti 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 sigħat; 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 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 mitħun għal kull g ħamrija piż fin-niexef għal enchytraeids (11). L-ewwel razzjon ta' ikel għandu jitħallat 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 mħejjija 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).

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 ittieħdlu 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.

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 C_a 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-radju-attività 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 jittieħdilhom 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.

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..

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;

— 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.

(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 standardisierten 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 bioaccumulation. 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.

(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.

(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.

(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.

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-fażi 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·kg^{-1} piż fin-niexef tad-dudu) diviż bil-konċentrazzjoni tal-kimika fil-midjum tal-madwar (C_s bħala g·kg^{-1} tal-piż fin-niexef tal-ħamrija); il-BAF għandu l-unitajiet ta' kg ħamrija·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·kg^{-1} tal-organiżmu, u C_s bħala konenut organiku g·kg^{-1} tal-ħamrija; il-BSAF għandu l-unitajiet ta' lipidi kg OC·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-fażi 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.

Il-**fażi 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-fażi tal-ħamrija. k_s huwa espress f'g ħamrija kg^{-1} ta' dudu d^{-1}.

Il-**fażi 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.

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):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[ekwazzjoni 5]}$$

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.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[ekwazzjoni 10]}$$

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 minnu 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)).

Appendiċi 3

EŻEMPJI TA' SKEDI GĦAL TESTIJIET TA' AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' ĦAMRIJA

Test tal-ħniex

(a) Fażi 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;
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;
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);

Jum	Attività
– 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 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;
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).

Appendiċi 4

Ħamrija artifiċjali – rakkomandazzjonijiet dwar tħejjija u ħżin

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).

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.

Appendiċi 5

Speċi ta' oligochaetes terrestri rrakkomandat għall-ittestjar ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn ħamrija

Ħniex

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 intersegmentali 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. Landwirtsch. 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.

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 anossiċi (eż. jekk jintuża għatu, it-toqob tal-għatu għandhom ikunu għoljin biżżejjed li jipprovdu bdil suffiċjenti ta' arja). Il-ħamrija tat-trobbija għandha titrewwaħ billi tithawwad b'attenzjoni darba fil-ġimgħa.

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."